

Buchhandel erschienen.

# DIE I MINOGRUPPEN IM

Ein Beitrag  
zur Ermittlung seiner Konstitution.

## HABILITATIONSSCHRIFT

zur

ERLANGUNG DER VENIA LEGENDI

für das

GEBIET DER PHYSIOLOGIE

einer

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER  
UNIVERSITÄT LEIPZIG

vorgelegt von

Dr. phil. et med. Joseph Kapfhammer

Assistent am physiologisch-chemischen Institut der  
Universität Leipzig.

E3G, 92Z2

1925

113 N25

1 Buchhandel erschienen.

Überreicht vom Verfasser.



# DIE FREIEN INOGRUPPEN IM EIWEISS

Ein Beitrag  
zur Ermittlung seiner Konstitution.

## HABILITATIONSSCHRIFT

zur

ERLANGUNG DER VENIA LEGENDI

für das

GEBIET DER PHYSIOLOGIE

einer

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER  
UNIVERSITÄT LEIPZIG

vorgelegt von

Dr. phil. et med. Joseph Kapfhammer

Assistent am physiologisch-chemischen Institut der  
Universität Leipzig.

1925

E96,92Z2

113 N25

Im Buchhandel erschienen.

Überreicht vom Verfasser.

# DIE FREIEN AMINOGRUPPEN IM EIWEISS

Ein Beitrag  
zur Ermittlung seiner Konstitution.

## HABILITATIONSSCHRIFT

zur

ERLANGUNG DER VENIA LEGENDI

für das

GEBIET DER PHYSIOLOGIE

einer

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER  
UNIVERSITÄT LEIPZIG

vorgelegt von

Dr. phil. et med. Joseph Kapfhammer

Assistent am physiologisch-chemischen Institut der  
Universität Leipzig.

E96,92Z2

1925

113 N25

2133

# Die freien Aminogruppen im Eiweiß.

## Ein Beitrag zur Ermittlung des Aufbaus von Proteinen.

Allgemein biologisch betrachtet darf das „Eiweiß“ bestimmter eindeutiger Funktionen auch als ein einheitlicher Begriff aufgefaßt werden. Diese Anschauung steht nicht im Einklang mit der des Chemikers, der ihm das Charakteristikum eines chemischen Individuums ableugnen muß. Es fehlen hierfür viele Voraussetzungen und Anforderungen, wie z. B. die Kenntnis der Eiweißkonstitution, der Molekulargröße und anderer chemischer und physikalischer Kennzeichen. Wenn auch die Elementaranalyse zeigt, daß am Aufbau des Eiweißes nur wenige Elemente teilhaben, daß ferner die Beteiligung des Kohlenstoffs, Wasserstoffs, Stickstoffs innerhalb enger Grenzen ziemlich konstant ist, so können daraus eben doch keine Schlüsse auf den inneren Aufbau des Eiweißes gezogen werden. Sagt ja schon bei einem viel kleineren Molekül die elementare Zusammensetzung nichts mehr über seine Konstitution aus.

## Die Bausteine.

Die bisherigen Methoden der Konstitutionsermittlung beruhten darauf, daß man das so gut als möglich gereinigte Eiweiß einmal einem vollständigen Abbau unterwarf, um so die Art und Menge seiner Bausteine festzustellen suchte. Dies ist die Voraussetzung für alle weiteren Untersuchungen. Aber schon hier sind sehr große Schwierigkeiten zu überwinden. Nur teilweise und nur bei verhältnismäßig einfach gebauten Proteinen (Gelatine, Zein, Protamin) ist dies einigermaßen gelungen.

Dann baute man nur teilweise ab, man erhielt also größere Komplexe; aus diesen fast unentwirrbaren Gemischen glückte es, einige einfach gebaute Spaltstücke zu fassen. Ihr Aufbau wurde durch die vollständige Spaltung festgelegt und durch die Synthese dann einwandfrei gesichert. Es ist das Verdienst von E. Fischer, die Synthese in dieses Arbeitsgebiet eingeführt zu haben. Damit hat er die Peptidbildung im

Eiweiß sichergestellt oder sie, wenn wir heute noch vorsichtiger sein wollen, doch unter den Produkten der fermentativen Spaltung absolut sicher bewiesen.

Der vollständige Abbau des Eiweißes kann durch Fermente oder durch längeres Kochen mit Mineralsäuren oder Basen erreicht werden. Auf diese Weise wurden aus den verschiedensten tierischen und pflanzlichen Proteinen 20 Bausteine isoliert, deren Struktur zum größten Teil erkannt und durch Synthese erwiesen ist. Sie besitzen alle mindestens eine Carboxylgruppe und tragen am benachbarten Kohlenstoffatom eine primäre Aminogruppe; eine Ausnahme bilden nur Oxyprolin und Prolin, die statt der Aminogruppe die sekundäre Iminogruppe des Pyrrolidinringes enthalten. Alle Proteine enthalten die gleichen Aminosäuren, nur einzelne können in einzelnen fehlen. Für manche Arten von Proteinen gibt es besonders charakteristische Gruppen, die verhältnismäßig häufig vorhanden sind und dadurch dem betreffenden Eiweiß ein eigenes Gepräge verleihen. In den Protaminen erreicht der Basengehalt ca. 70% des Proteingewichtes, in den Histonen etwa 30%; manche Proteine des Stützgewebes (Glutin, Elastin) besitzen einen Glykokollgehalt von 25—35%, die Globuline nur 3%, den Albuminen fehlt dieser Baustein ganz; auch das Casein enthält kein Glykokoll. Die alkohollöslichen Prolamine sind Vertreter vegetabilischer Eiweißstoffe, die sich durch einen sehr hohen Gehalt an Glutaminsäure auszeichnen. So wechselt das Bild ständig, und es entstehen Unterscheidungsmerkmale zwischen den einzelnen Eiweißkörpern, die auch ihre biologische Wertigkeit beeinflussen und sie in verschiedenen Grade befähigen, die täglich zugrunde gehende Körpersubstanz, die Abnutzungsquote der Eiweißstoffe, wieder zu ersetzen.

Da wir über die feineren Vorgänge bei diesem Ersatz des Körper-eiweißes durch das Proteingemenge der Nahrung nichts Genaues wissen, wir uns aber vorstellen können, daß die spezifisch eingestellten Fermente hier die gesamten Prozesse regeln werden, so hat es auch ein ganz erhebliches physiologisches Interesse, einen tieferen Einblick in die Konstitution des Eiweißmoleküls zu gewinnen. Auch von diesem Gesichtspunkte aus wurde die vorliegende Untersuchung begonnen.

## Die Peptidbindung.

Es erhebt sich weiterhin die Frage, wie die durch Abbau des Proteins erhaltenen Aminosäuren im Eiweiß selbst miteinander verbunden sind.

Hofmeister legte in seinem berühmten Vortrag in Karlshad im Jahre 1902 auf Grund von Überlegungen und des damals nur sehr spärlich vorhandenen Beobachtungsmaterials, überzeugend dar, daß der Hauptsache nach nur eine säureamidartige Verknüpfung in Frage kommen kann.

Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen (-C-C-) sind ausgeschlossen, sie würden sich nicht durch einfaches Kochen mit starken Säuren und Laugen sprengen lassen. Wo das ausnahmsweise einmal möglich ist, liegen ganz besondere Verhältnisse vor, wie z. B. Anhäufung von sauerstoffhaltigen Gruppen in der Nachbarschaft.

Säureanhydridartige Verbindung ist nicht vereinbar mit dem neutralen Charakter des Proteins, weil dabei die basische Aminogruppe nach außen wirksam hleihen müßte.

Esterbindungen können möglich sein, würden aber nur selten vorkommen, da im Eiweiß zu wenig Oxyaminosäuren vorhanden sind. Dies dürfen wir heute schon sagen, obwohl uns sicher nur ein kleiner Teil der vorhandenen Oxyssäuren infolge der großen Schwierigkeit bei der Aufarbeitung der Hydrolysate zu isolieren geglückt ist. Erst vor wenigen Jahren fand Dakin (1917) im Kasein eine neue Oxyssäure, die  $\beta$ -Oxy- $\alpha$ -aminoglutarensäure, die dort sogar zu 10% vorhanden ist; in der Gelatine scheint sie zu fehlen. Dagegen hält Dakin das Vorkommen weiterer Oxyaminosäuren über das zu 0,4% isolierte Serin hinaus für sehr wahrscheinlich. Und eben erst fand Schryver wieder eine neue Oxyaminosäure, das Oxylysin, im Hydrolysat des Fischleims. Der unbekannte Stoff, der im Hydrolysat noch steckt, erklärt sich aber im großen und ganzen genügend durch die Löslichkeit und Wandelbarkeit der bekannten Bausteine. Im Falle der Esterbindung müßte indes auch eine basische Aminogruppe übrig hleihen.

Für die schwer hydrolysiere Ätherbindung, die auch möglich wäre, gelten die gleichen Überlegungen.

Als seiner Zeit Hofmeister seine Gedanken über die säureamidartige Bindung im Eiweiß zum Ausdruck brachte, war bereits die Meisterhand E. Fischers mit einem großen Stah von Mitarbeitern am Werk. E. Fischer faßt in seinem berühmten Vortrag in der Deutschen Chemischen Gesellschaft in Berlin im Jahre 1906 seine Ansicht über die Struktur des Eiweißmoleküls wie folgt zusammen: „In der großen Ähnlichkeit der künstlichen Polypeptide mit den Peptonen, insbesondere bezüglich des Verhaltens gegen Pankreassaft, ferner in der Gewinnung des Glycyl-d-alanin-anhydrids aus Seide darf man eine neue, starke Stütze für jene Ansicht erblicken.

Daß man mit dieser Art der Verkettung allein aus den bis jetzt bekannten natürlichen Aminosäuren schon eine recht stattliche Anzahl von Proteinen theoretisch ableiten kann, liegt auf der Hand und ist von Hofmeister in populärer Form ausführlich gesagt worden. Besonders mannigfaltig wird natürlich das Bild durch die Beteiligung der Aminocarbonsäuren (Asparagin- und Glutaminsäure), sowie der Diaminesäuren (Lysin, Arginin usw.).

Ich möchte aber hier darauf aufmerksam machen, daß die einfache Amidbindung nicht die einzige Möglichkeit der Verknüpfung im Proteinmolekül ist. Im Gegenteil, ich halte es sogar für recht wahrscheinlich, daß einerseits Piperazininge dort vorkommen, deren leichte Sprengung durch Alkali und Rückbildung aus den Dipeptiden oder ihren Estern ich so häufig bei den künstlichen Produkten beobachtet habe, und daß andererseits die zahlreichen Hydroxyle der Oxyaminosäuren keineswegs indifferente Gruppen im Proteinmolekül sind. Die letzteren könnten durch intramolekulare Anhydridbildung in Ester- oder Äthergruppen übergehen, und die Mannigfaltigkeit würde sich noch erhöhen, wenn man Polyoxyaminosäuren als wahrscheinliche Bestandteile des Eiweißes voraussetzt. Es liegt kein Grund vor, diese Betrachtung weiter auszuspinnen, aber es schien mir doch nötig, auf die verschiedensten Möglichkeiten hinzuweisen, um allzu einseitigen Anschauungen, die der experimentellen Forschung hinderlich werden können, vorzubeugen.

In dem Aufbau der Proteine und ihrer verschiedenen komplizierten Derivate hat die Natur, soviel wir wissen, ihre höchste chemische Leistung erreicht, und es würde aller Erfahrung der organischen Chemie und der Biologie widersprechen, wenn sie sich hier auf nur wenige Typen beschränkt hätte.“

Nur durch den Vergleich sämtlicher physikalischer, chemischer und biologischer Eigenschaften der von E. Fischer hergestellten synthetischen Polypeptide und der aus der partiellen Eiweißhydrolyse gewonnenen Peptide konnte der endgültige Beweis für die Einheitlichkeit des künstlichen und des natürlichen Produktes geliefert werden.

Der Vergleich und die Übereinstimmung der Löslichkeit, des Schmelz- und Zersetzungspunktes, der spezifischen Drehung, im Zusammenhang mit den entsprechenden Eigenschaften der dargestellten Derivate, waren überzeugend; zum Schluß kam noch der zwingende Nachweis, daß die Fischerschen Produkte auch durch die natürlichen Fermente gespalten werden. Die Spaltbarkeit durch natürliche Fermente allein als Beweis

gelten zu lassen, war nicht angängig, denn man wußte, daß auch körperfremde Peptide von diesen Fermenten angegriffen werden, ja sogar solche, die aus optischen Antipoden aufgehaut waren.

Durch Fermente, Einwirkung von Wasser bei erhöhter Temperatur, von Mineralsäuren, Alkalien, oxydierenden Mitteln, Mikroorganismen erfahren die Eiweißstoffe und ihre Umwandlungsprodukte eine mehr und mehr fortschreitende hydrolytische Spaltung, welche, wenn die spaltenden Kräfte stark genug sind, schließlich eine vollständige wird (Zerfall in Aminosäuren und Diaminosäuren). Aus der großen Zahl intermediärer Spaltungsprodukte, welche bei diesem Prozeß neben- und nacheinander auftreten, sind unzweifelhafte chemische Individuen bisher nur in kleiner Zahl isoliert worden. Sie stellen alle schon verhältnismäßig kleine Moleküle dar und gehören in die Gruppe der Polypeptide. Die Hauptmenge des Gemisches der Spaltungsprodukte, speziell die ganze Menge der der Muttersubstanz noch näher stehenden und noch Eiweißcharakter zeigenden Produkte der Hydrolyse, harrt trotz vielfacher Bemühungen noch der Entwirrung. Man nennt nach einem Vorschlage von Kühne die durch Ammonsulfat ausfällbaren Spaltungsprodukte Albumosen, die durch dieses Salz nicht fällbaren und noch die Biuretreaktion gebenden nennt man Peptone, und man nimmt an, daß erstere größere Moleküle darstellen, während in den Peptonen Produkte einer weiter vorgeschrittenen Hydrolyse vorliegen.

Diese Auffassung ist nicht mehr aufrecht zu halten, seitdem man weiß, daß manche einfach zusammengesetzte Polypeptide ebenfalls durch Ammonsulfat aussalzbar sind, während andere komplizierter gehaute diese Fällbarkeit nicht zeigen. Skraup und v. Hardt-Stremayr legen der Abspaltung von Ammoniak, die beim Beginn der Hydrolyse erfolgt, Bedeutung für die Bildung von Albumosen bei. Das Prinzip, auf dem diese Trennung beruht, das verschiedene Verhalten der einzelnen Spaltungsprodukte Salzen gegenüber, ist auch zur weiteren Aufteilung der Albumosen benutzt worden. Es mag jedoch ausdrücklich bemerkt werden, daß eine Isolierung chemischer Individuen mit diesen Methoden nicht möglich ist.

Die Schwierigkeit, aus den Peptongemischen genau definierte Bruchstücke herauszuholen und als einheitlich zu charakterisieren, ist sehr groß. Die einzelnen Substanzen sind sich alle in chemischer Hinsicht zu ähnlich. Zur systematischen Aufarbeitung der Peptone verwendete Hofmeister deshalb Fällungsmittel, die auf ganz bestimmte chemische

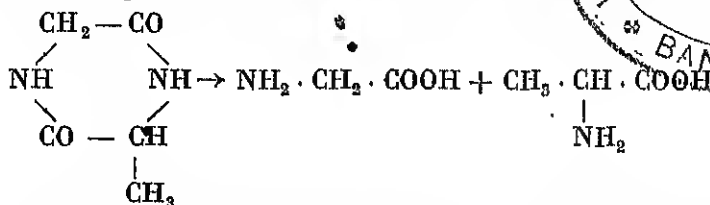


Gruppen eingestellt waren: z. B. Phosphorwolframsäure, Quecksilbersulfat usw., also Fällungsmittel, mit denen or gewisse Bausteine (Hexenbasen, Cystein) mit charakteristischen Gruppen immerhin in einzelnen Fraktionen anreichern konnte. Die gleiche Überlegung und gewissermaßen die Fortsetzung dieser präparativen Arbeitsweise gab Siegfried: er kam mit seiner Eisen-Ammoniak-Methode und mit der Phosphorwolframsäurefällung zu Kyrinen, die hauptsächlich aus Arginin, Lysin sowie aus Glutaminsäure oder aus Glykokoll bestanden; diese Kyrine sind basische Körper, welche kristallisierte Phosphorwolframate lieferten. Siegfried betrachtete sie als einheitliche Substanzen, eine Anschauung, der nicht von allen Seiten zugestimmt wurde.

Schienen die methodischen Schwierigkeiten, „höhere Komplexe“ mit einheitlichem Charakter aus den Peptongemischen abzutrennen, nahezu unüberwindlich, so waren die Versuche zur Isolierung „niederer Komplexe“ von besserem Erfolge begleitet. Die von E. Fischer als Pelypeptide bezeichneten amidartigen Anhydride der Aminosäuren teilen wir nach der Anzahl der miteinander verknüpften Aminosäuren in Di-, Tri-, Tetrapeptide usw. ein. Ihre direkte Isolierung aus den Peptongemischen, etwa durch Kristallisation, ist selten möglich. Schon besser zugänglich sind sie in Form der Diketopiperazine, die man — oft unbeabsichtigt — erhält, wenn man die Ester der Dipeptide mit alkoholischem Ammoniak behandelte. Sie sind Anhydride der Dipeptide, die sich leicht durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln gewinnen lassen. Eine dritte Möglichkeit zur Isolierung der niederen Peptide gibt uns ihre Fähigkeit, sich mit Naphthalinsulfachlorid zu gut definierbaren Körpern zu vereinigen.

E. Fischer beschritt diesen Weg, um aus natürlichem Eiweiß Peptide abzuspalten; durch 24-stündige Hydrolyse von Seidenfibrin mit konzentrierter Salzsäure und durch nachfolgende geeignete Aufarbeitung kam er schließlich zu einem Dipeptid, dessen Naphthalinsulfaverbindung er isolierte. Wahrscheinlich handelte es sich um Naphthalinsulfglycylalanin; eine sichere Identifizierung, sowie eine genaue Reproduzierung dieser Substanz war aber nicht möglich. Einige Jahre später war von Fischer und Abderhalden (1907) mit Hilfe einer anderen Methode ein Dipeptid aus Seidenfibrin hergestellt worden, dessen Struktur bewiesen werden konnte: es war das Glycyl-d-alanin. Die Methode beruhte auf der Trennungsmöglichkeit der Neumaminoester von den Estern der Dipeptide: jene sind flüchtig, diese nicht. Durch Überführung der Ester der Dipeptide in die Diketopiperazine und durch nachfolgende hydrolytische Spaltung wur-

den die einzelnen Bausteine gekennzeichnet. So enthält man aus dem Methyldiketopiperazin die Aminosäuren Glykokoll und d-Alanin:



In ähnlicher Weise kamen Fischer und Abderhalden zu dem Dipeptid Glycyl-l-tyrosin (aus Seide), zu Glycyl-l-leucin (aus Elastin); zu Glycyl-l-prelin (aus Gelatine); sie isolierten ferner aus Seide ein Tetrapeptid, das bei vollständiger Hydrolyse in die drei Bausteine Glykokoll, d-Alanin, l-Tyrosin zerfiel.

### Weitere Schlußfolgerung über die Struktur zufolge der Peptidbildung.

Unter der Voraussetzung, daß die Bausteine des Eiweißes peptidartig miteinander verknüpft sind, bestehen zwei Möglichkeiten:

1. das Eiweiß ist eine lange Kette;
2. es besteht aus mehreren oder vielen kurzen Ketten, die gewissermaßen parallel geschaltet werden; sie sind durch die oben erwähnten anderen Bindungen (Ester, Äther, Säureanhydrid) oder durch Partial-Valenzen miteinander verknüpft.

In beiden Fällen müssen wir endständig saure und basische Gruppen haben. Im ersten Fall je eine Carboxyl- und Aminogruppe oder dergleichen, im zweiten Fall mehrere oder viele. Wieviele, läßt sich nur sagen, wenn wir das Molekulargewicht des Eiweißes kennen.

### Die Molekülgröße der Eiweißkörper.

Zu ihrer Bestimmung benutzt man chemische oder physikalische Methoden. Voraussetzung ist natürlich immer eine möglichst weitgetriebene Reinheit und Einheitlichkeit des Protein. Schon diese Reinigung ist mit sehr großen Schwierigkeiten verknüpft, die erst neuerdings wieder Sørensen am Eialbumin gezeigt hat.

Die chemischen Methoden geben immer Äquivalentgewichte. Das Molekulargewicht läßt sich nur mit physikalischen Methoden bestimmen.

Dabei glaubte man, sich des osmotischen Druckes bedienen zu können, zumal gewisse Werte des Äquivalentgewichtes mit dem so am nativen Eiweiß gewonnenen Molekulargewicht, ausgezeichnet übereinstimmen (z. B. Hämoglobin). Andere Molekulargewichte, die durch kryoskopische oder ebullioskopische Messungen in bestimmten Lösungsmitteln (Phenolen, Eisessig) erhalten wurden, waren wesentlich kleiner und stimmten auch überein mit anderen Äquivalentgewichten des nativen Eiweiß und dessen Derivaten, die man bei der Salzbildung mit Säuren und bei der Fällung mit gewissen Kolloiden ( $\text{Cr}[\text{OH}]_3$ ) erhalten hatte. Man schließt heute daraus, daß das native Eiweiß nicht ein einziges Riesenmolekül darstellt, sondern daß es aus vielen Elementarkomplexen (Abderhalden) besteht, die durch lockere Kräfte (Nebenvalenzen) zusammengehalten werden. Nach Bergmann „treten in den hochmolekularen Naturstoffen der Kehlenhydrat- und Proteingruppe die Bausteine (Zucker, Aminosäure) unter Wasserabspaltung in kleiner Zahl zu Gruppen zusammen, welche infolge ihrer Affinitätsverteilung für sich unbeständig sind und einen stabilen Affinitätsausgleich nur durch Zusammentritt einer großen Anzahl wesensähnlicher Gruppen finden, die nur in ihrer Gesamtheit einer Aufteilung in molekular-disperse kleinere Elemente erfolgreichen Widerstand entgegensetzen.“

### Das Eiweiß als amphoterer Elektrolyt.

Das Eiweiß ist im großen und ganzen eine neutrale Substanz, wie sich am besten aus den Bestimmungen seines isoelektrischen Punktes ergibt. Es bindet aber sowohl Basen wie Säuren, wenn es in eine Lösung gebracht wird, in der diese im Überschuß vorhanden sind, denn der Basen- oder Säuregehalt dieser Lösung nimmt dadurch ab; auf geeignete Weise kann man auch das unveränderte Eiweiß ausfällen und dann durch die Analyse die Bindung von Alkali oder Säure einwandfrei bestimmen. Ebenso werden Neutral-Salze gebunden. Das Eiweiß verhält sich hier nicht anders wie seine Bausteine, für die Pfeiffer eine große Reihe von Komplexverbindungen mit den verschiedensten Neutralsalzen hergestellt hat. Diese Bindung von Säure- und Basenresten an die basischen und sauren Gruppen im Eiweiß geht einher mit einer Änderung der physikalischen Eigenschaften des Eiweißes, seines Dispersionsgrades, der Viskosität seiner Lösung, seiner Fällbarkeit usw. Auch die Fällung durch Salze von Schwermetallen, wie Eisen, Quecksilber, Kupfer, oder durch Alkaloide reagentien darf wohl zu der Bildung von Komplexverbindungen der genannten Reagentien mit Ammoniak und Ammoniakderivaten in Parallele gesetzt

werden. Alles dies spricht für das Vorhandensein von endständigen Carboxylgruppen und einer entsprechenden Anzahl basischer Reste.

Der Nachweis der Carboxylgruppe läßt sich nach Willstätter leicht durchführen. Spiro und Löffler sowie Foreman hatten bereits darauf hingewiesen, daß manche Ammonsalze bei Zusatz von Glycerin, Aceton oder Alkohol zur Lösung so verändert werden, daß die Dissoziation des basischen Anteils zurückgedrängt wird. Der saure Anteil läßt sich dann, wie Willstätter gezeigt hat, mit Lauge titrieren. Er hat diese Beobachtung zu einer sehr brauchbaren Methode vervollkommenet. Auch bei der Formoltitration von Sørensen wird das Carboxyl im Eiweiß verwendet und abgesättigt; also auch hier ist sein Nachweis wohl gegeben.

Die freien basischen Gruppen brauchen keine primären Aminogruppen zu sein, auch die Iminogruppe und die Guanidogruppe des Arginin kommen in Betracht. Daß Letztere wenigstens zum Teil frei vorhanden und nicht zur Verknüpfung des Arginin verwendet worden ist, hat Kossel nachgewiesen, indem er das Eiweiß (meist benutzte er argininreiche Protamine) mit starker Salpetersäure behandelte und dabei das Arginin nitrierte. Aus den Hydrolyseprodukten konnte Nitroarginin isoliert werden; eine entsprechende Menge Arginin fehlte. Lieben hat die Nitrierung des Proteins weiter untersucht, die Aufspaltung kontrolliert und die Anzahl der Nitrogruppen, die ins Eiweiß eintreten, bestimmt. Tyrosin wird in Orthostellung nitriert, Tryptophan beteiligt sich ebenfalls.

Die Amino- und Iminogruppe läßt sich durch Formaldehyd in Methylenverbindungen überführen (Schiffsche Reaktion); dadurch schwindet ihr basischer Charakter, ein entsprechendes Äquivalent Säure wird mit Natronlauge titrierbar (Sørensen). Die primäre Aminogruppe reagiert mit salpetriger Säure unter Entwicklung von Stickstoffgas; van Slyke hat die Reaktion zu einer Bestimmungsmethode für primäre Aminogruppen ausgearbeitet.

Auch das Eiweiß reagiert nach der Methode von Sørensen und von van Slyke. In manchen Proteinen stimmen die Werte überein, in anderen wieder nicht; im allgemeinen werden natürlich die „Sørensen“-Werte höher liegen. Die „van Slyke“-Werte sind von Kossel und von Osborne zum Lysingehalt des Eiweißes in Beziehung gebracht worden. van Slyke schloß aus seinen Bestimmungen, daß der Stickstoff der freien Aminogruppen gleich sei der Hälfte des Lysinstickstoffs. Kossel drückt sich vorsichtiger aus; er betonte nur den Parallelismus zwischen beiden in

der Art, daß die lysinfreien Proteine keine freien Aminogruppen enthalten und daß unter den anderen meist diejenigen reicher an freien Aminogruppen sind, die auch mehr Lysin enthalten. Damit steht im Einklang, was Edlbacher durch die Bestimmung der N-Methylzahl bei verschiedenen Proteinen gefunden hat, und was Felix noch einmal durch sorgfältige Bestimmungen des Lysingehaltes und des freien Aminostickstoffs (nach Sørensen und van Slyke) bei Arachin, Glycinin und Gelatine geprüft hat. Es ging daraus hervor, daß nicht der ganze mit Phosphorwolframsäure fällbare Stickstoff mit Formol titriert werden kann, also nicht nur Lysin sein kann, und daß somit nach van Slyke zu hohe Lysinwerte erhalten werden. Für eine gesetzmäßige quantitative Beziehung zwischen Lysingehalt und freiem Amino-N, die für alle Eiweißkörper gilt, fehlen die Unterlagen. Es ist doch auch gar nicht wahrscheinlich, daß die Bausteine in allen Proteinen in gleicher Weise gebunden sind. Für einige Proteine, wie für das Casein mag die Annahme van Slynkes zutreffen, bei anderen jedenfalls nicht (Histone, Sturin, Gelatine, Glycinin). Bei den Histonen übertrifft der freie Aminostickstoff den Lysinstickstoff sehr, daß sicher auch noch andere Bausteine ihre Aminogruppe frei, unbesetzt haben. Mit diesen Beobachtungen stimmen solche an Desaminoproteinen überein. Schon Skraup hat Eiweiß mit salpetriger Säure behandelt und unter den Hydrolyseprodukten dann das Lysin nicht mehr oder nur in stark verminderter Menge aufgefunden. Solche desamidierte Proteine sind inzwischen noch vielfach untersucht worden; die Untersuchungen haben dazu beigetragen, die oben entwickelten Anschauungen zu stützen. Gerade beim Lysin häufen sich die Schwierigkeiten der Isolierung. Denn es steckt ja im Filtrat der Silberbarytfällung, in die also auch alle Verunreinigungen mit hineingeraten, die die voluminöse Phosphorwolframsäure-Fällung mitgerissen und eingeschlossen hat. Man kann stets nur einen Bruchteil des Stickstoffs dieser Fraktion als Lysinpräparat zur Wägung bringen.

Es wurde oben schon die N-Methylzahl erwähnt. Kossel und Edlbacher stellen sich vor, daß die freie Aminogruppe im Eiweiß bei der Behandlung mit methylierenden Reagentien (Jodmethyl, Diazomethan oder Dimethylsulfat) betainisiert wird. Nach der Zeißelschen Methylamidbestimmung, die sich auch als Mikromethode durchführen läßt, würde also ein methyliertes Protein am Stickstoff jeder freien Aminogruppe je zwei Methylene tragen. Herzig und Landsteiner glauben, daß nur eine Methylgruppe aufgenommen wird, und daß diese auch an die Säureamid-

bindung geht; sie haben mit Diazemetban gearbeitet. Die rechnerische Verwertung der N-Methylzahl stößt also auf Schwierigkeiten, solange die Voraussetzung dafür nicht experimentell sichergestellt ist. Auch der Guanidiokeru des Arginin nimmt indessen wahrscheinlich Methyl an (Felix).

Als Äcylquotient bezeichnet Siegfried das Verhältnis Schwefel: Stickstoff; beide bedeuten atomare Mengen in einem Protein oder dessen Bruchstück, das mit Arylsulfocbloreid behandelt ist. Der Quotient soll keineswegs ausdrücken, daß die Sulfocbloreide nur mit den Aminogruppen reagiert haben. Das Verhältnis ist nur gewählt, weil der Stickstoff leicht bestimmt werden kann.

Außer den Aminogruppen reagiert aber hier auch das Guanidin (Rießer, Siegfried). Bei der Äcylierung von Eiweißkörpern können auch weitgehende Spaltungen eintreten. Siegfried erinnert schon daran, daß Imidazol (Bamberger und Berlé) und seine in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Stellung alkylierten Homologen (Windaus und Kneep; Windaus) sowie andere Imidazolderivate aufgespalten werden. Eine Carboxylgruppe in der Seitenkette des Imidazol schützt den Ring vor der Aufspaltung (Windaus, Kessel und Edlbacher, Gerngroß), fehlt diese oder ist sie nicht mehr frei, so wird der Ring aufgespalten (Windaus und Kneep, Fränkel). Dementsprechend schwindet die Diazereaktion nach der Äcylierung des Eiweißes. Schon Kessel weist darauf hin, denn auch im intraprotein gebundenen Histidin ist die Carboxylgruppe besetzt. Siegfried betont, daß der Äcylquotient eine wichtige konstante Zahl sei, daß es aber unzulässig ist, aus seiner Größe direkt Schlüsse auf die Konstitution von Peptonen und Proteinen zu ziehen.

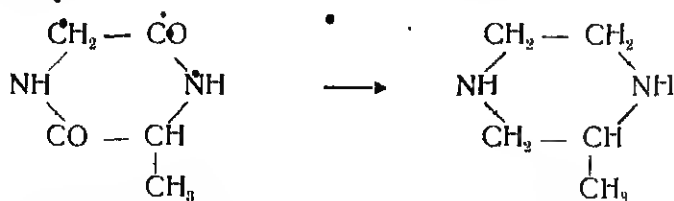
Siegfried hat den Carbaminoquotienten in unser Schrifttum eingeführt. Die Aminosäuren binden bei niedriger Temperatur in Kalk- oder Baryt-alkalischer Lösung Kohlensäure. Sie gehen in die Carbaminsäuren über, die sich als Erdalkalisalze gewinnen lassen. Bei höherer Temperatur zersetzen sie sich wieder. Man bestimmt den Erdalkaligehalt und setzt ihn in Beziehung zum Stickstoffgehalt. Für die einfachen Bausteine und für die höheren Spaltprodukte hat Siegfried in diesem Quotienten ein wertvolles Kriterium der Reinheit und Einheitlichkeit seiner Substanzen gefunden. Auch die Proteine binden Kohlensäure, sogar bei Körpertemperatur. Die Reaktion ist biologisch sicher von der allergrößten Bedeutung. Zur Charakterisierung des Protein ist die Reaktion aber bisher nicht benutzt worden.

## Das Eiweiß als Anhydridkomplex.

Die Kettenstruktur des Stärkemeleküls ist heute verlassen, sie hat immer etwas Unbefriedigendes gehabt, sie paßt nicht zu dem schrittweisen Abbau durch die diastatischen Fermente. Man faßt sie heute als einen Komplex von Anhydriden des Zuckers auf, ohne den einzelnen Baustein bereits mit Sicherheit zu kennen. Allor Voraussicht nach ist darunter ein Anhydrid der Maltose. Ganz ähnlich aufgebaut muß auch die Zellulose sein, im Ganzen nur komplizierter und nur dann aufspaltbar, wenn die anhydridartigen Bausteine gleichzeitig weitgehend verändert werden. Diese Untersuchungen gehen auf Pietet, Pringsheim, Karrer, Brigl, Heß und andere zurück. Es liegt nahe, sich auch das Eiweißmolekül ähnlich aufgebaut zu denken.

Bei seiner Aufspaltung wurden die Anhydride von Dipeptiden, die schon Fischer gut bekannten Diketopiperazine, mehrfach beobachtet. Sie bilden sich leicht aus Dipeptiden und werden auch leicht wieder aufgespalten. Ihre Auffindung als solche beweist also noch nicht ihr primäres Vorkommen im Protein. Ssadikow und Zelinski haben Eiweiß mit dünner Säure im Autoklaven bei 160° aufgespalten. Sie glauben, solche Anhydride aufgefunden zu haben. Bei dieser Temperatur entstehen aber, wie Brigl gezeigt hat, diese Anhydride aus den Peptiden.

Treansegard reduziert Eiweiß, das er durch Acetylieren und Methylieren alkohollöslich gemacht hat, mit Natrium in siedendem Alkohol. Er spaltet dann auf, bläst die basischen Anteile mit Wasserdampf über und sucht nach den Reduktionsprodukten der Anhydride, d. h. dem Piperazin und seinem Hemelegen. Er fand Piperidin und Pyrrolbasen. Abderhalden und Stix isolierten Piperazin und Methylpiperazin. Letzteres muß aus einem Anhydrid des Alanylglycin entstanden sein. Das Dipeptid ist aus Eidensfibroin, mit dem Abderhalden auch arbeitete, bereits mehrfach isoliert worden.



Auch ein Reduktionsprodukt des Seryl-alanin-anhydrid hat Abderhalden gefaßt.

Statt durch Reduktion können die Anhydridkomplexe auch durch Oxydation so verändert werden, daß charakteristische Derivate entstehen die aus den Peptiden nicht erhalten werden. Auch hier haben Abderhalden und Komm ganz neuerdings bemerkenswerte Ergebnisse erzielt.

Doch muß man sich immer vor Augen halten, daß diese Änderungen im Eiweißmolekül nur mittels sehr eingreifender Operationen erzielt werden. Gewiß ist das Verhalten reiner Peptide und seiner Anhydride unter den gleichen Bedingungen geprüft worden. Aber in einem Gemisch mit so komplizierter Zusammensetzung und den mannigfaltigsten Bausteinen mögen manche Reaktionen anders ablaufen als in reiner Lösung. Ein Unterschied, wie er ja jedem präparativ arbeitenden Chemiker bekannt ist.

Abderhalden hat nach weiteren Beweisen für das primäre Vorkommen der Diketopiperazine im Eiweiß gesucht. Sasaki hat gefunden, daß die Jaffésche Reaktion, d. h. eine Reduktion der Pikrinsäure zur Pikraminsäure in alkalischer Lösung nicht nur vom Kreatinin gegeben wird, sondern noch von einer ganzen Reihe von Stoffen, wenn die Einwirkung lange genug dauert oder bei höherer Temperatur vor sich geht. Auch die Diketopiperazine geben diese Farbreaktion, die Peptide und Aminosäuren aber nicht. Letzteres wurde von Abderhalden ausführlich nachuntersucht, die Beobachtung bestätigt und erweitert. Mancher Eiweißkörper gibt nun die Reaktion auch, und daraus zieht Abderhalden den Schluß, daß seine Annahme über das Vorhandensein von Diketopiperazinen im Eiweiß zu Recht besteht. Er variierte auch die Reaktion, indem er die Pikrinsäure durch m-Dinitrobenzol ersetzte.

Damit ist nicht gesagt, daß die Peptidbindung im Eiweiß nicht vorkommt. Im Gegenteil hält er diesen, von Fischer und Abderhalden selbst erhobenen Befund, vollkommen aufrecht. Er betont nur, daß darüber hinaus sich auch noch weitere Bindungen, eben diese anhydridartigen Verbindungen finden.

Manche Eiweißkörper werden vom Tickkörper in flüssigem Zustand ausgeschieden; außerhalb des Tickkörpers polymerisieren sie sich. So entsteht der Seidenfaden aus der Spinnrüse; und gerade mit Seide, einem relativ einfachen Eiweißkörper, hat Abderhalden gearbeitet. Bergmann und Miekeley haben das Schema für diesen Vorgang als Modell benutzt, indem sie ein Anhydrid aus Glykokoll und Serin herstellten. Das Diketopiperazin spaltet ein weiteres Molekül Wasser ab und geht in einen Körper über, der in organischen Lösungsmitteln leicht löslich ist, auch in



Wasser. In diesem verändert er sich aber schon nach ganz kurzer Zeit, er geht in eine Substanz von gleicher Zusammensetzung über, die jedoch jetzt in Wasser fast ganz unlöslich geworden ist.

Da sich Eiweiß mit Ausnahme der Seide und ähnlicher Keratine durch die Fermente unseres Verdauungskanals aufspalten läßt, so muß man dies auch von den Anhydriden verlangen. Daß dies geschieht, ist noch nicht sicher gestellt. Schon die Säure des Magensaftes oder das Alkali der Verdauungssäfte im Darm genügt zur Aufspaltung der Diketopiperazine; im Körper, in der Zelle herrscht aber eine neutrale Reaktion; dort kann Eiweiß bei der Autolyse bis zum Aminosäuregemisch aufgespalten werden; diese Pepsasen müssen dann auch die Diketopiperazine aufspalten können. Allerdings muß man dann auch hier bedenken, daß sich das freie Diketopiperazin anders verhalten kann, als das allmählich aus dem Eiweiß herausgeschälte und erst freiwerdende. Die Fermente werden wohl berufen sein, zu entscheiden, ob die Anhydride im Eiweiß wirklich primär verbildet sind, in welchen Eiweißkörpern sie es sind und in welchen nicht. (Waldschmidt-Leitz.)

# I. Neue Versuche zur Konstitutionsermittlung.

## Das eigene Arbeitsgebiet.

Wir haben uns in der vorliegenden Untersuchung die Frage vorgelegt, ob eine präparative Festlegung der Aminogruppen im Eiweiß möglich ist; wir stellten uns die Aufgabe, die freien Amino- und Iminogruppen so zu verändern, daß sie hydrolysebeständig bleiben. Aus dem Schrifttum sind, wie oben bereits besprochen, verschiedene ähnliche Problemstellungen bekannt; es ist dort allerdings meist nicht am Eiweiß selbst, sondern an seinen Spaltprodukten gearbeitet worden. Nur Blum sowie Hirayama acylierten, Landsteiner und Kossel-Edlbacher methylierten genuine Proteine. A priori könnte man bei dem riesengroßen Molekül des Eiweißes ein unentwirrbares Gemisch von den an der Aminogruppe belasteten Eiweißbausteinen erwarten. Es kann aber auch sein, daß nur einige wenige Bausteine mit ihrer basischen Gruppe frei sind, und daß gerade dies ein Charakteristikum des betr. Protein darstellt. Wie stets: es kam auf den Versuch an.

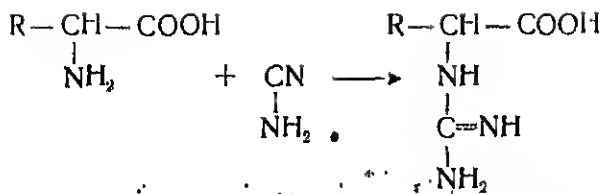
## I. Acylierung.

Wir haben verschiedene Eiweißkörper acyliert, in erster Linie sulfoniert, da die Sulfogruppe verschiedene Vorteile bietet. Diese Untersuchungen sind noch ziemlich im Anfang steckengeblieben, da die beiden anderen Methoden mehr Zeit und Arbeit beanspruchten, als ursprünglich zu erwarten war. Dieser Teil der Arbeit wird inzwischen weitergeführt.

## II. Cyanamidanlageung.

### Überführung der Amino- (Imino-) Gruppe in Guanidin.

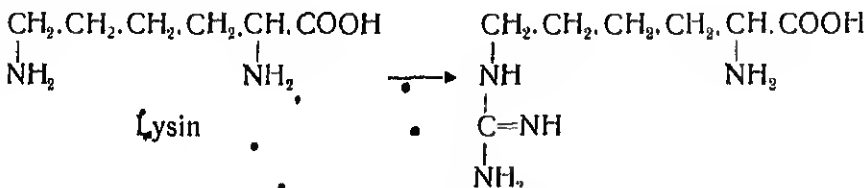
Eine zweite Art, die Aminogruppe festzulegen, beruht auf dem Prinzip der Streckerschen Synthese: durch Anlagerung von Cyanamid an die Aminosäure entsteht eine Guanidosäure.



Versuche, das Cyanamid an Eiweiß selbst anzuhängen, sind aus dem Schrifttum noch nicht bekannt. Clementi hat im Kosselschen Institut Cyanamid an das Dipeptid Glycylglycin angelagert.

In der Staehelinschen Klinik in Basel wurde von Fujinami die Anlagerung von Cyanamid an Glykokoll und an ein Pepton, das durch schonende Alkalihydrolyse aus Seide hergestellt war, untersucht. Das von Fujinami gewonnene Guanidopepton stellte ein gelblichweißes, nicht hygroskopisches Pulver mit einem Stickstoffgehalt von 20,4% dar, das nach seiner Hydrolyse mit 20%iger Salzsäure nach der Methode von van Slyke auf freien Aminostickstoff geprüft wurde; es enthielt 8,4%  $\text{NH}_2\text{-N}$ , der Gesamtstickstoffgehalt betrug 20,4%. Das Pepton hatte vor der Behandlung mit Cyanamid einen  $\text{NH}_2\text{-N}$ -Gehalt von 5,1% und einen Gesamtstickstoffgehalt von 14,4% N; nach der Hydrolyse war der Aminostickstoff auf 13,7% angestiegen.

Wenn man Gelatine in wässriger, schwach ammoniakalischer Lösung mit Cyanamid versetzt, so könnte sich dieses möglicherweise an die freien Aminogruppen anlagern. Es müßten dann einmal Guanidosäuren, ähnlich wie Kreatin entstehen, und weiterhin durch Anlagerung an das Lysin ein homologes Arginin.



Auch andere Wege, um die Aminogruppe in die Guanidogruppe überzuführen, wurden von uns beschritten; wir haben vorerst das Cyanamid nur deswegen angewandt, weil es heute aus dem Kalkstickstoff in beliebiger Menge billig zur Verfügung steht. Auch lagert es sich unter ganz milden Bedingungen an, eine Neubildung von Aminogruppen aus

dem natürlichen Protein erscheint dabei unwahrscheinlich. Diese Bedingungen erfüllen die anderen Methoden der Guanidierung nicht so ohne weiteres.

Die Guanidosäuren würden dann bei der sauren Hydrolyse unter Wasseraustritt und Ringschluß mehr oder weniger leicht in die Glykocyanidine übergehen. Es würden dadurch neue basische Bestandteile im Hydrolysat auftreten.

Wir haben deswegen Casein und Gelatine mit Cyanamid behandelt, das so veränderte Eiweiß hydrolysiert und im Hydrolysat nach den veränderten Bausteinen gesucht.

Eine Kontrolle, ob sie Cyanamid angelagert hatten, gab auch das Verschwinden von freiem Aminestickstoff, der im Eiweiß nach van Slyke bestimmt werden kann. In der Tat war dieser bei der Gelatine, die uns als Ausgangsmaterial gedient hat, etwa dreieinhalb mal so groß, als er nach der Behandlung mit Cyanamid gefunden wurde. Entsprechend hatte auch das Eiweiß an Gesamtstickstoff (nach Kjeldahl bestimmt) zugenommen. Diese Zunahme war aber größer als den verschwundenen freien Aminegruppen entspricht. Es mußte sich also das Cyanamid auch noch an Gruppen angelagert haben, die nach van Slyke nicht reagieren. Die Guanidgruppe des Arginin kommt wohl kaum in Betracht. Es bleibt dann, soviel wir heute wenigstens wissen, nur die Imingruppe des Prolin und Oxyprolin übrig. Es ist dies ein bemerkenswerter Befund. Bisher nimmt man an, daß das Prolin im Innern der Peptide steht, also mit Carboxyl- und Imingruppe gebunden ist.

Die experimentellen Schwierigkeiten, die sich uns bei der Isolierung der neuen basischen Produkte boten, waren unerwartet groß. Einmal wissen wir ja nicht, wie weit Ringschluß bei der Hydrolyse eingetreten ist. Soweit uns die Aminosäuren zur Verfügung standen oder die Guanidosäuren auf andere Weise zugänglich waren, haben wir sie hergestellt und ihr Verhalten unter den Bedingungen der Hydrolyse untersucht. Die Belastung mit Alkylgruppen kann den Ringschluß begünstigen oder hemmen, was a priori nicht zu sagen ist. Eine zweite Schwierigkeit besteht darin, daß wir die Basen mit Phosphorwolframsäure von den übrigen Bestandteilen des Hydrolysats abgetrennt haben. Ihre Weiterverarbeitung geschieht bei alkalischer Reaktion. Dadurch werden die Ringkörper mehr oder weniger wieder aufgespalten, aus den Basen entstehen neutrale und sehr schwer lösliche Guanidosäuren, die im Bariumniederschlag hängen bleiben. Denn diese Körper werden sich nicht anders verhalten als das Kreatinin, von

dem Hahn in den letzten Jahren gezeigt hat, daß seine Aufspaltung oder die umgekehrte Reaktion nur eine Funktion der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung ist.

Trotzdem bedienten wir uns zunächst der Phosphorwolframsäure und arbeiteten auf dem üblichen Weg weiter, d. h. wir teilten durch Silber und Baryt weiterhin auf. Hier mußte sich allordings eine dritte Schwierigkeit ergeben. Die Glykoeyamidine werden eine andere Basizität haben als das Arginin und sein Homologes. Sie werden also bei einem andern Barytgehalt der Lösung gefällt werden. Diesen Unterschied dachten wir gerade zur Trennung ausnutzen zu können. Kossol hat die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung mit der Indikatorenmethode kontrolliert und auf diese Weise eine schärfere Trennung von Histidin und Arginin erzielt. Durch weitere Fraktionierung mit Hilfe der entsprechenden Indikatoren haben wir beim Kasein die Fraktion aufgeteilt.

Im zweiten Versuch arbeiteten wir nur in saurer Lösung. Inzwischen hatten Kossel und Groß die 2—4-Dinitro-1-naphthol-7-sulfosäure unter dem Namen Flaviansäure als Fällungsmittel für das Arginin eingeführt. Sein Homologes mußte damit auch gefällt werden können. Es sei aber schon an dieser Stelle bemerkt, daß auch diese Methode nicht zum Ziel führte. Wir konnten das Homologo aus der Fraktion nicht herauskristallisieren. Kroatinin gibt ein leicht lösliches Salz. In der Fraktion aus der Cyanamid-Gelatine stockten aber reichliche Mengen von Substanzen, die die Kristallisation des Arginin, die ja sonst sehr vollständig vor sich geht, hemmten. Das spricht immerhin dafür, daß das Homologo vorhanden war.

Aus der Mutterlauge bekamen wir schließlich auf einem langen Weg, mit Hilfe der Pikrolonsäure, kleine Mengen kristallisierter Salze; ihre Elementarzusammensetzung läßt aber keinen Schluß auf ein bestimmtes atomares Verhältnis zu. Wir scheinen trotz des einheitlichen Aussehens der Kristalle Gemische in Händen zu haben.

Wir haben gedacht, das Homologe des Arginin mit Hilfe der Arginase abtrennen zu können. Das Arginin würde auf diese Weise aus den mit Silberbaryt fällbaren Substanzen entfernt werden. Wir haben racemisches Arginin erhalten. Während der langen Aufbewahrung des Eiweißes zur Cyanamidanlagerung bei schwach ammoniakalischer Reaktion ist die Racemisierung offenbar eingetreten. Es ist ja bekannt, daß sich das intraprotein gebundene Arginin leichter racemisiert als das freie. Die Mutterlauge des Arginin, die das Homologe enthalten mußten, und die bei bestimmter Reaktion gefällten Basen gaben mit Arginase überhaupt keine Spaltung,

obwohl das gereinigte Arginasepräparat auf natürliches Arginin kräftig reagierte. Auch das spricht dafür, daß wir das Arginin-Hemologe in Händen haben.

Auch für die Isolierung der Glykoeyamidine mußten wir eine Methode finden, bei der die saure Reaktion erhalten blieb. Die Vorversuche mit der Carbaminreaktion Siegfrieds versprachen in unserem Falle wenig Erfolg. Wir sahen von ihr ab. Der Zufall kam uns zu Hilfe. Unter den Komplexen von Chromsalzen ist fast am längsten das sogenannte Morland-Salz bekannt. Seine Konstitution hat Werner aufgeklärt. Es ist das Guanidinsalz der Reineckesäure. Diese gibt mit Glykoeyamidinen und auch mit Kreatinin, das man ja ebenfalls als Guanidinderivat anzusprechen hat, sehr wenig lösliche kristallinische Niederschläge. Diese noch nicht veröffentlichte Beobachtung wurde im hiesigen Laboratorium von Torada benutzt, um das Kreatinin und andere Basen im Harn gewichtsanalytisch zu bestimmen. Die Reinecke-Säure fällt aber, wie schon Christensen gezeigt hat, auch sekundäre und tertiäre Basen. Als sekundäre Base findet sich im Hydrolysat das Prolin und Oxyprolin und diese waren also bei der Aufarbeitung der Reineckefällung zu erwarten. In der Tat fanden wir sie. Vielleicht haben wir auch ein Dipeptid aus Prolin und Oxyprolin in die Hände bekommen; seine Identifizierung ist uns wegen Materialmangels noch nicht möglich gewesen. Wir erinnern aber an die Beobachtung von Dakin, der aus dem Hydrolysat der Gelatine das Anhydrid eines derartigen Dipeptides aufgefunden hat. Es würden also die beiden Bausteine in der Gelatine miteinander verkettet sein, eine Beobachtung, die neu ist.

Die Fällung mit Reineckesalz läßt sich vielleicht zu einer präparativen Darstellung des Prolin und Oxyprolin ausarbeiten. Beide Bausteine sind heute nur schwer rein zu erhalten.

### III. Methyliertes Eiweiß.

Die freie Amino-Gruppe kann bei der Methylierung 1, 2 oder 3 Methylgruppen aufnehmen. Kossel glaubt, daß Betaine entstehen, und daß die Imino-Gruppe der Peptidbindung unangegriffen bleibt. Herzog und Landsteiner meinen, daß alle Stickstoffamine eine Methylgruppe aufnehmen können. Durch die analytische Festlegung der N-Methylzahl ist die Frage nicht geklärt worden, wie oben auseinanderzusetzen. Es schien mir möglich, auf präparative Weise die Frage zu lösen, wenn sich ein Weg findet, die in großer Menge entstandenen normalen unveränderten Bausteine aus

dem Hydrolysat zu entfernen. Dies ist mit chemischen Mitteln nur sehr schwer möglich, denn der basische Charakter der Betaine ist nicht groß, und das Verhalten der weniger methylierten Aminosäuren gleicht durchaus denjenigen der nicht methylierten Muttersubstanzen. Dem Organismus gegenüber mit seinen fein abgestuften Fermenten verhalten sich die Methylprodukte aber ganz anders. Es mußte also ein Leichtes sein, die große Menge der normalen Bausteine aus dem Hydrolysat wegzubringen, indem man dieses verfütterte und jene vom Tierkörper verbrennen ließ. Zurück blieben im Harn entweder die Betaine oder die weniger methylierten Aminosäuren oder beide Arten von Substanzen, die sich durch Phosphorwolframsäure voneinander trennen lassen mußten.

Aus hydrolysiertem methyliertem Kasein haben wir auf diese Weise das Halbbetain des Lysin dargestellt, Monomethylaminosäuren dagegen trotz sorgfältigem Durchsuchen aller Fraktionen nicht gefunden. Damit steht sicher, daß die ondständige Aminogruppe des Lysin wenigstens bei einem Teil des Lysin frei ist. Ein Resultat, das das bei dem cyanamidierten Protein erhaltene stützt. Ob in anderen Proteinen nicht auch Monomethylaminosäuren oder andere Betaine auftreten, können wir natürlich nicht sagen, dazu müssen weitere Versuchsergebnisse abgewartet werden.

Wir haben ferner  $\delta$ -Aminovaleriansäure aus dem Harn isoliert. Dadurch, daß wir die freien Aminosäuren verfüttert haben, konnte ihre Muttersubstanz mehr als es unter physiologischen Bedingungen möglich ist, der Fäulnis anheimfallen.

## II. Versuchsteil.

### Cyanamidiertes Eiweiß.

#### Darstellung von Cyanamid.

Das zu den folgenden Versuchen benötigte Cyanamid wurde aus Kalkstickstoff,<sup>1</sup> nach Bann dargestellt. Der Kalkstickstoff wurde mit Wasser nach dem Gegenstromprinzip ausgezogen, der wässrige Auszug mit Schwefelsäure vom Kalk befreit, die ganz schwach saure Lösung wurde im Vakuum eingedunstet und der Destillatückstand mit Äther ausgezogen. Auf diese Weise ist das Cyanamid leicht zugänglich geworden. Aus 2 kg Kalkstickstoff wurden etwa 200 g Cyanamid gewonnen.

Das aus der Ätherlösung beim vorsichtigen Einengen anskristallisierte Cyanamid ist schon für die weitere Verarbeitung rein genug. Es hält sich im Exsikkator über Schwefelsäure aufbewahrt monatelang. Baum gibt an, daß es durch eine reduzierende Substanz verunreinigt ist. Wir haben diese Beobachtung bestätigt. Doch reagiert diese Verunreinigung wohl kaum mit den Aminogruppen des Eiweißes, so daß wir von einer weiteren Reinigung absahen. Diese ist außerdem mit großen Verlusten verknüpft.

#### Anlagerung von Cyanamid an Casein.

50 g Casein Hammarsten werden in 500 g destilliertem Wasser und 5 cem konzentriertem Ammoniak gelöst. Im Verlauf von einem Monat werden 4,0 g Cyanamid unter weiterem Zusatz von 1 cem Ammoniak in der Mischung aufgelöst. Es scheiden sich reichlich Dicyandiamidkristalle ab. Die Lösung gibt bis zum Schluß starke Cyanamidreaktion. Nach einem Monat wird das Casein mit Schwefelsäure ausgefällt und mit Wasser unter Zusatz von Natriumsulfat solange ausgekocht, bis es frei von Cyanamid und Dicyandiamid ist. Dann wird nach einander mit Wasser und Alkohol auf der Zentrifuge gewaschen und mit Äther getrocknet. Zum Schluß im Vakuum bei 100° über Phosphorsäureanhydrid bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ein Teil des Eiweißes wird ebenso wie das unbehandelte Casein mit Schwefelsäure hydrolysiert, und die Stickstoffverteilung der basischen

<sup>1</sup>) Wir erhielten ihn in dankenswerter Weise unberechnet von den Stickstoffwerken-Plestenitz zur Verfügung gestellt.



Bestandteile in der üblichen Weise bestimmt. Die Ergebnisse zeigt die untenstehende Zusammenstellung. Es ergibt sich also, daß durch die Cyanamid-Behandlung die Lysinfraktionen um etwa ebenso viel Stickstoff verlieren hat, als die Argininfraktion gewonnen hat. Hätte sich die ganze Menge des Argininhomelegen, die aus dem Lysin entstanden ist, der Argininfraktion beigesellt, so hätte der Stickstoffgehalt dieser Fraktionen um etwa das dreifache desjenigen Verlustes zunehmen müssen, den die Lysinfraktionen erlitten hat. Im Gesamtstickstoff des mit Cyanamid behandelten Protein hat die Menge um das Doppelte dieses Verlustes zugenommen. Das war zu erwarten, wenn nur das Argininhomelege entstanden ist. Dieser Schluß ist aber natürlich nur berechtigt unter der Voraussetzung, daß das Argininhomelege vollständig und nur dieses sich in der Argininfraktion wiederfindet.

	Kasein	Cyanamid-Kasein
in 100 g Hydrolysat		
Gesamt-N	14,39 g	15,45 g
Ammoniak-N	1,301	0,521
Arginin-N	1,006	1,615
Histidin-N	0,601	0,443
Lysin-N	1,053	0,443

### Anlagerung von Cyanamid an Kasein im Grossen.

Hier wurde ein billigeres Handelspräparat von Kasein verwendet, das 11,48%  $H_2O$ , 11,66% N und 0,856% S enthielt. Die Wasserbestimmung wurde in der Weise ausgeführt, daß ca. 0,5 g der Handelsware bis zur Gewichtskonstanz bei 110° über Phosphorsäureanhydrid und Kaliumhydroxyd getrocknet wurden. Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl, der Schwefel nach Asbath bestimmt. Zu einer Aufschwemmung von 1 kg Kasein in 5 l Wasser wurden 100 g 20%iges Ammoniak gefügt, wodurch eine opalisierende Lösung entstand. In dieser wurden 100 g Cyanamid aufgelöst. Zur Verhinderung der Fäulnis wird außerdem etwas Chloroform zugefügt. Die Mischung bleibt 5 Wochen bei Zimmertemperatur, häufig umgeschüttelt, stehen. Es blieb noch freies Cyanamid in Lösung. Das Kasein wird dann mit 175 ccm Eisessig ausgefällt, die Fällung abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen; noch feucht in 5 l Wasser unter Zusatz von 150 ccm 33%iger Natronlauge gelöst, wieder ausgefällt, nochmals in 1 l Wasser mit 100 ccm Lauge gelöst, wieder mit Eisessig ausgefällt, schließ-

lich nochmals in ammoniakhaltigem Wasser gelöst und mit Schwefelsäure ausgefällt. Das Filtrat enthält dann kein Cyanamid mehr. Durch dieses häufige Umfällen war das Handelspräparat gleichzeitig gereinigt worden, und an den sonst nötigen großen Mengen Alkohol war gespart worden. In einer Probe des feuchten Kasein wird das Wasser bestimmt und daraus als Ausbeute 386 g Trockensubstanz berechnet.

## Anlagerung von Cyanamid\* an Gelatine im Grossen.

### Darstellung des Ausgangsmaterials.

400 g lufttrockener Gelatine (Marke: Silberdruck) mit einem Gehalt von 14,46% Stickstoff und 16,44% Wasser wurden in 1100 ccm heißem Wasser gelöst. Die saure Lösung wird mit 9 ccm 20%igem Ammoniak gegen Lackmus neutralisiert. In Abständen von je zwei Tagen werden viermal je 5 g Cyanamid zugesetzt; gleichzeitig wird die Reaktion gegen Lackmus geprüft und, wenn nötig, wurde etwas Ammoniak bis zum Eintreten von schwach alkalischer Reaktion zugegeben. Diese mit Cyanamid versetzte Gelatinelösung steht ca. 3 Monate lang bei 37° im Brutschrank; sie ist mit Toluol gedeckt worden. Alle 10—14 Tage wird mit Silbernitrat geprüft, ob Cyanamid noch im Überschuß vorhanden ist; es war stets der Fall. Nach 3 Monaten werden 5 ccm mit der Pipette entnommen und im Rundkolben sofort mit 300 ccm 99%igem Alkohol versetzt; dann wird eine Stunde auf dem Wasserbad unter Rückfluß gekocht. Der abfiltrierte Alkohol gibt sehr starke Cyanamidreaktion. Die im Kolben hart gewordene Gelatine wird nochmals mit 100 ccm 99%igem Alkohol gekocht; der dann abgessene Alkohol gibt keine Cyanamidreaktion mit Silbernitrat.

Die rückständige Gelatine wird im Exsikkator über Calciumchlorid mit Schwefelsäure getrocknet; es verbleiben 1,3799 g. Davon werden 0,1701 g im Schiffchen bei 110° im Vakuum über  $P_2O_5$  und KOH bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Gewichtsabnahme betrug 0,02 g. Hieraus berechnet sich ein Wassergehalt von 11,5%.

0,0794 g der wasserfreien Substanz wurden in 10 ccm Wasser gelöst. Die Mikro-Kjeldahl-Bestimmung in 1 ccm der Lösung gab 1,354 mg N = 17,05%. Mikro-van Slyke in 2 ccm der Lösung gab 0,052 mg  $NH_3$ . Auf 100 g N entfallen also 1,92 g  $NH_3$ .

Zum Vergleich mit diesen Analysenwerten wurden 2 g der gleichen behandelten Gelatine in wenig warmem Wasser gelöst und die Lösung mit 100 ccm 99%igem Alkohol eine Stunde lang unter Rückflußkühlung auf dem Wasserbade erhitzt. Der Alkohol wurde hierauf abgossen und die zurückgebliebene Gelatine im Exsikkator über Calciumchlorid und Schwefelure getrocknet. Davon wurden 0,194 g im Vakuum über  $P_2O_5$  und KOH bei  $110^\circ$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Wasserabnahme = 0,023 g = 11,85%, also ähnlich wie im vorigen Versuch. 0,1074 g der wasserfreien Substanz wurden in 10 ccm Wasser gelöst. In 1 ccm der Lösung gab die Mikro-N-Bestimmung nach Kjeldahl 1,54 mg N = 16,21% N, die Mikrobestimmung nach van Slyke in 2 ccm der Lösung 0,151 mg  $NH_3$ -N. Auf 100 g N entfallen also 4,9 g  $NH_3$ -N.

Zur besseren Übersicht gebe ich folgende Zusammenstellung:

Ges. N in %	Gelatine	Cyanamid-Gelatine		
	16.21	17.05	17.09	17.25
van Slyke N auf 100 g Ges. N.	4.9	1.92	2.22	1.7

## Versuche zur Isolierung von Guanidosäuren aus Eiweißhydrolysaten.

### a) Gelatinehydrolyse mit und ohne Zusatz von Guanidoessigsäure.

Je 7,27 g Gelatine wurden mit je 30 g konzentrierter Schwefelsäure und 60 ccm Wasser 30 Stunden am Rückfluß gekocht; der einen der beiden Lösungen wurde außerdem noch 1,2223 g Guanidoessigsäure -- 0,438 g Stickstoff zugesetzt. Im Hydrolysat wurde die Stickstoffverteilung bestimmt. Es interessierte uns, in welcher Fraktion sich der der Guanidoessigsäure entstammende Stickstoff anhäuft. Aus der folgenden Übersicht ist das weitere ersichtlich, daß die größte Stickstoffanreicherung im Phosphorwolframsäureniederschlag stattgefunden hat. Die fehlenden 35% der Guanidoessigsäure sind wahrscheinlich im Barytniederschlag hängen geblieben, dem sie sich wegen der Schwerlöslichkeit der Säure auch nicht durch Kochen mit Wasser entziehen ließen.

	Gelatine	Gelatine + Guanidoessigsäure
Gesamtstickstoff des Hydrolysats	1,0275	1,425 statt 1,466 g
NH <sub>3</sub> N	0,0045	0,0034
PWS Niederschlag	0,130	0,352 d. h. 0,222 g oder 50% mehr
PWS Filtrat	0,627	0,688 d. h. 0,061 g oder 15% mehr

Aus diesen Analysenworten darf der Schluß gezogen werden, daß der größte Teil des Guanidosäuren-Stickstoffs im PWS-Niederschlag aufzufinden ist, d. h. aus der neutralen Guanidosäure ist unter den Bedingungen der Hydrolyse, durch längeres Kochen mit starker Säure, das basische Glykocyamidin entstanden; dem entspricht, daß die Hauptzunahme in der Argininfraktion steckt (infolge der Fällbarkeit des Glykocyamidin durch Silber und Baryt.)

Wir prüften diese Verhältnisse in analoger Weise an einer Gelatine, der an Stelle der Guanidoessigsäure ihr Homologes, die  $\alpha$ -Guanidopropionsäure zugesetzt worden war. Die Guanidopropionsäure wurde mit Hilfe der Strecker'schen Synthese gewonnen, indem Cyanamid mit d-Alanin, das aus Eiweiß gewonnen war, in Reaktion gebracht wurde. Die Guanidosäure war analysenrein.

## 2) Gelatinehydrolyse mit Zusatz von Guanidopropionsäure.

Je 6,486 g Gelatine wurden mit 60ccm Wasser und 30g konzentrierter Schwefelsäure, in dem einen Falle unter Zusatz von 0,6975 g Guanidopropionsäure (= 0,218 g Stickstoff) hydrolysiert. Bei der Aufarbeitung verteilte sich der Stickstoff auf folgende Fraktionen:

	Gelatine:	Gelatine + Guanidopropionsäure
Gesamt-N des Hydro- lysates	0,838	1,056 ber. 1,056 g
PWS Niederschlag	0,112	0,282 g N d. h. 0,170 g N mehr oder rund 80%
PWS Filtrat	0,635	0,650 g N

enso wie bei der Hydrolyse der guanidoessigsäurehaltigen Gelatine fällt auch hier der größte Teil des Stickstoffs der Guanidopropionsäure auf den PWS-Niederschlag; entsprechend dem leichten Überang der Guanidopropionsäure in Alakreatinin (Baumann), wurden er nicht 50, sondern 80% gefunden. Wir haben hier stillschweigend vorausgesetzt, daß die  $\alpha$ -Guanidosäuren bei der Hydrolyse, d. h. beim Kochen mit Mineralsäuren in ihre basischen Anhydride übergeben.

Nach diesen orientierenden Vorversuchen gingen wir dazu über, in der Gelatine die Möglichkeit einer Cyanamid-Anlagerung im Sinne der trockenersehen Synthese zu untersuchen. Im Hydrolysat dieser mit Cyanamid behandelten Gelatine mußte die Stickstoffverteilung darüber Aufschluß geben, ob eine Neubildung von Guanidosäuren stattgefunden hat. Es wurde eine Lösung von 20 g Gelatine in 50 ccm heißem Wasser im Verlaufe von 4 Wochen mit 5 mal 1 g Cyanamid, also einem sehr großen Überschuß, versetzt. Dieses Gemisch von Cyanamid und Gelatine steht, mit Toluol zur Verhütung der Fäulnis bedeckt, 6½ Monate lang bei 37° im Brutschrank. Zum Schluß wird immer noch Cyanamid durch die Silberreaktion nachgewiesen. Die Lösung wurde mit Alkohol übergossen, und es entstand eine Fällung solange mit Alkohol ansgekocht, bis weder Diamid noch Cyanamid mit Hilfe der Silberreaktion in dem Niederschlag nachzuweisen war. Das Eiweiß wurde dann mit 60 g konzentrierter Schwefelsäure und 120 ccm Wasser 20 Stunden hydrolysiert. Im Hydrolysat verteilt sich der Stickstoff folgendermaßen:

Im Gesamthydrolysat:	1,8 g N
NH <sub>3</sub> N :	0,033 g N
Im PWS-Niederschlag:	0,252 g N
Im PWS-Filtrat:	1,062 g N

Vergleichen wir das Verhältnis des im PWS-Niederschlag befindlichen Stickstoffs zum Gesamtstickstoff (es ist 1 zu 7,18) mit dem entsprechenden Wert der reinen Gelatine (siehe den Versuch mit Guanidopropionsäure), der 1 : 7,48 ist, so spricht dies für eine Stickstoffanreicherung im PWS-Niederschlag. Vergleichen wir außerdem die Stickstoffverteilung zwischen PWS-Niederschlag und PWS-Filtrat, so haben wir bei der reinen Gelatine ein Verhältnis von 1 : 5,68 und bei der Cyanamidgelatine ein solches von 1 : 4,2. Diese Werte deuten auf eine ähnliche Verschiebung der Stickstoffverteilung, wie wir sie im Hydrolysat der Gelatine,

die mit Guanidoessigsäure und Guanidopropionsäure versetzt worden war, beobachtet haben. Richtiger wäre es, den Gehalt an basischem Stickstoff in Prozent des Gesamtstickstoffs der entsprechenden Menge unbehandelter Gelatine anzugeben. Es ist dies aber unmöglich, da wir nicht wissen, wieviel Stickstoff aus Cyanamid an die Gelatine gebunden werden ist, und wieviel Gelatine wir beim Auskochen mit Alkohol verloren haben.

## Hydrolyse des Kasein.

Das mit Cyanamid vorbehandelte Kasein wurde mit 1100 g Schwefelsäure in 33%iger Lösung auf dem Ölbad 24 Stunden unter Rückflußkühlung gekocht. Die überschüssige Säure wird durch heiße Barytlösung entfernt. Hydrolysat und Waschwasser des Bariumsulfatniederschlages werden auf 2,6 l eingengt. Die Lösung gibt eine positive Millon- und Diazo-Reaktionen, eine schwach positive mit Glyoxylsäure; die Schwefelblei-, Biuret-, Jaffé- und Woylsche Probe sind negativ.

Die basischen Bestandteile werden mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Phosphorsäureniederschlag enthält 10,6 g Stickstoff, sein Filtrat 33,6 g. Im Bariumsulfat stecken noch 3 g Huminstickstoff. 22,5% des Gesamt-Niederschlag waren also durch Phosphorwolframsäure fällbar. Im unbehandelten Kasein hat van Slyke 21,5% in dieser Fraktion gefunden. Die hier beobachtete leichte Vermehrung ist in Wirklichkeit stärker als zum Ausdruck kommt, da der Gesamtstickstoff ja im behandelten Kasein ein höherer geworden war.

## Die basischen Bestandteile.

Der Phosphorwolframsäure-Niederschlag wird mit Acetonwasser und Baryt zerlegt. In das klare Filtrat wird Kohlensäure eingeleitet, das Filtrat vom Bariumkarbonat im Vakuum auf 550 ccm eingengt. In dieser Lösung sind noch die Reaktionen auf Tryptophan und Tyrosin schwach, die Diazoreaktion deutlich wahrnehmbar. Obwohl die Lösung aber jetzt an den vermuteten Glyceeyamidinen reicher geworden sein muß, bleibt die Probe von Jaffé und Weyl negativ. Die Diacetylreaktion läßt sich in der gefärbten Lösung nicht durchführen.

Es wird jetzt die weitere Aufteilung mit Silber-Baryt vorgenommen. Die Glykeeyamide gehen dabei zum größten Teil in die Argininfraktionen.

Es wird mit nitritfreier Salpetersäure bis zu schwach kongesaurer Reaktion versetzt und hierauf mit soviel konzentrierter Silbernitratlösung, bis bei der Tüpfelprobe mit Baryt sofort eine braune Fällung erhalten wird. Es werden 43 g Silbernitrat verbraucht.

## Die mit Silber fällbare Fraktion. "

Nach der alten Methode von Kossol-Kutseher wurde nun die weitere Fraktionierung in der Weise durchgeführt, daß bei neutraler Reaktion das Histidinsilber entfernt und danach der Rest der mit Silber fällbaren Basen bei Sättigung mit Baryt vom Lysin abgetrennt wurde. Neuerdings teilen Kossel und Edlbacher diese Fraktionen noch weiter auf, indem sie die Reaktion stufenweise ändern und durch den Umschlag von bestimmten Indikatoren festlegen. Arginin fällt bei Eintritt der Phenolphthaleinlösung ( $p_H$  8,3) noch nicht, ist aber vollständig gefallen bei Eintritt der Bläuung von Thymolphthalein ( $p_H$  9,3). Kreatininsilber fällt ebenfalls bei  $p_H$  8,3 noch nicht, ist aber auch bei  $p_H$  9,3 noch nicht vollständig gefallen.

In der Gelatine ist die  $\alpha$ -ständige Aminogruppe des Lysin frei (van Slyke, Felix); lagert sich Cyanamid an, so entsteht ein Homologes des Arginin. Seine Darstellung ist vergeblich im Laboratorium von Skraup durch Heckel und von Winterstein und Küng versucht worden. Beide führen nur Salze an, die sie erst nach Überwindung großer Schwierigkeiten zur Kristallisation brachten. Bei welchem  $p_H$  diese Basen völlig ausgefallen sind, ist also noch nicht bekannt. Die Fällung des Kreatinin ist bei  $p_H$  9,3 noch nicht beendet. Ein Versuch zeigte, daß dies bei  $p_H$  12,1 der Fall ist.

Deshalb ging ich bei der weiteren Aufteilung der mit Silber fällbaren Basen in folgender Weise vor:

Es wird mit ausgekochter Salpetersäure bis zur schwach kongesauerten Reaktion angesäuert und hierauf soviel von einer konzentrierten Silbernitratlösung (1 + 2) zugefügt, bis die Tüpfelprobe mit Barytlösung sofort eine braune Fällung gibt; verbraucht wurden 43 g Silbernitrat. Es wurde nun soviel einer kaltgesättigten Barytlösung zugefügt, bis in einer entnommenen Probe, die zur Entfernung des Silbers mit Natriumchlorid versetzt werden war, durch Phenolphthalein gerade eine Rotfärbung, durch Thymolphthalein aber noch keine Blaufärbung entstand;  $p_H$  etwa

8,3 (Kossel und Edlbacher). Zum Absetzen der Silberfällung wird die Lösung 12 Stunden in den Eisschrank gestellt. Nachdem der aus Histidinsilber bestehende Niederschlag (I) abgesaugt und mit schwach barythaltigem Wasser der gleichen Reaktion gewaschen war, wird das Filtrat im Vakuum auf 600 cem eingengt und dazu soviel Barytwasser gegeben, bis eine durch Natriumchlorid vom Silber befreite abgenommene Probe mit Alizarin gelb ( $p_H$  10,1—12,0) umschlägt. Das Filtrat dieses Niederschlages (II) wird wieder im Vakuum eingedampft (bis zum Volumen 750 cem). Zu dieser Lösung kommt soviel Barytwasser, bis dadurch keine Trübung mehr eintritt, nach 24 Stunden wird der Niederschlag (III) abgesaugt. Das Filtrat steht nach Zugabe von fein verriebenem Baryt 12 Stunden lang, der entstandene Niederschlag (IV) wird abgesaugt. Dessen Filtrat wird als „Lysin-Fraktion“ bezeichnet.

Die vier, durch fraktionierte Barytfällung entstandenen Niederschläge werden mit Schwefelsäure und Schwefelwasserstoff zerlegt und die Sulfate bereitet. Die Stickstoff-Bestimmung nach Kjeldahl ergab für die einzelnen Fraktionen folgende Werte:

I. Fraktion	1,568 g N
II. „	3,363 g N
III. „	3,60 g N
IV. „	0,33 g N

Die Lysinfraktion enthält 2,88 g N.

## Aufarbeitung der mit Silber gefällten Niederschläge.

In diesen Fraktionen wurde die Schwefelsäure mit Baryt entfernt und die Lösung der Carbonate bereitet. Nachdem die letzten Spuren von Baryt sorgfältig entfernt waren, wurde auf 10 cem eingengt und entsprechend dem Stickstoffgehalt mit der berechneten Menge einer konzentrierten alkoholischen Pikrolonsäurelösung gefällt. Es wurden vier verschiedene Pikrolonate erhalten; ihre Ausbeuten, getrocknet im Exsikkator über KOH und  $H_2SO_4$ , sind:

I. 14,11 g Smp. 208°	Stickstoff nach Dumas	21,45%
II. 27,42 g „ 225	„ „ „	23,79%
III. 21,53 g „ 218	„ „ „	23,17%
IV. 1,05 g „ 218	„ „ „	23,21%



Histidindipikrolonat hat einen Stickstoffgehalt von 22,54%. Unser  
ert I ist also um 1% zu niedrig. Arginindipikrolonat besitzt den Smp. 225°  
d einen N-Gehalt von 23,94%; im Vergleich dazu stimmen unsere  
Werte der Fraktionen 2—4 annähernd überein. Der Stickstoffgehalt eines  
krolonats des Argininhemologen liegt bei 23,8%. Daraus ist zu ersehen,  
ß die Pikrolonate 2—4 Gemische von Argininpikrolonat und seinem  
omologen sein können.

### Zerlegung der Pikrolonate.

Durch Kochen mit Salzsäure wurde die Pikrolonsäure abgetrennt;  
ch dem Abfiltrieren der Pikrolonsäure und Ausäthern der salzsauren  
lösung im Sexhlet wurde die salzsaure Lösung stark eingengt und die  
rückbleibenden Sirupo wurden im Vakuumexsikkator über Natrenkalk  
fbewahrt. Sie kristallisierten nicht. Ebenso wurden die Mutterlauge der  
krolonate von der Pikrolonsäure befreit und in die Chlerydrate über-  
führt; auch sie zeigten nach monatelangem Stehen im Exsikkator keine  
igung zur Kristallisation.

Einzig und allein die Chlerydratfraktion I bildete nach mehreren  
ochen Kristalle, die, abgesaugt und im Vakuumexsikkator über Schwefel-  
uro und KOH getrocknet zur Analyse kamen. Sie konnten als Histidin-  
chlorhydrat identifiziert werden. N nach Dumas 18,52%, ber. 18,4%.

Die Fraktion II, die noch unveränderten Sirup darstellte, wurde  
it wenig Wasser aufgenommen und mit Silbernitrat gefällt; nach dem  
filtrieren des Silberchlorids und dem Entfernen des überschüssigen  
lbers mit Schwefelwasserstoff wird das Filtrat bis zum Sirup eingengt.  
steht zwei Tage und kristallisiert trotz Impfens mit Argininnitrat nicht.  
Umwandlung in das Kupfernitrattoppelsalz durch Kochen mit Wasser  
d Kupferkarbenat gibt nur blauen Sirup, der monatelang sirupös bleibt.  
itkupfern, Füllen mit PWS, Überführen in das Karbenat, Umwandlung  
das Flavianat und Zurückbildung des Karbonates sind vergeblich: das  
edukt kristallisiert nicht.

Wir machten auch einen Probeversuch mit Arginase, indem wir von  
r Überlegung ausgingen, daß wir dadurch, falls Razemisierung einge-  
eten wäre, die natürliche Komponente des Arginin abtrennen könnten;  
r konnten aber keine fermentative Wirkung nachweisen, obwohl unser  
ginasepräparat, wie ein Kontrollversuch bewies, wirksam war. Die  
gensehaft des Sirups, ein Flavianat gebildet zu haben, läßt darauf schlie-  
n, daß wahrscheinlich ein hemoleges Arginin vorliegt.

Aus der dritten Fraktion, die in das Nitrat übergeführt und dann mit Kupferkarbonat gekocht wurde, entstand ebenfalls ein blauer Sirup, der nicht kristallisierte. Nach Entfernung des Kupfers mit Schwefelwasserstoff wird das Filtrat ziemlich stark eingengt; es bleibt im Becherglas, nur mit Uhrschele gedeckt bei Zimmertemperatur einige Wochen stehen. Inzwischen hatten sich einige Kristalle gebildet, die nur schwer von dem dicken Sirup abzutrennen waren. Durch Absaugen gelang es, in 10 Stunden eine kleine Menge von Kristallen zu isolieren. Sie wurden auf Ton gestrichen und im Exsikkator getrocknet. Rohausbeute 0,6 g; Umkristallisieren aus 80%igem Alkohol. Über KOH im Exsikkator bei Zimmertemperatur getrocknet, zeigt das Präparat einen Smp. von 154—156°. Ausbeute 0,59 g. Nach zehnstündigem Aufenthalt im Vakuum bei 100° über  $P_2O_5$  und KOH nimmt die Substanz um 0,002 g ab. Smp. blieb scharf bei 154°; bei 156° Aufschäumen, dann Zersetzung.

Analyse: gef. 24,26% C 5,6% H 28,19% N  
ber. für Arginindinitrat 24,0% C 5,33% H 28,04% N.

Der im Schrifttum für Arginindinitrat angegebene Smp. liegt bei 144,5—145°. Aus dem Smp. unseres Präparates ist zu schließen, daß hier das d-l-Arginindinitrat vorliegt.

Aus der vierten Fraktion wurden geringe Mengen eines Chlorhydrates als Sirup gewonnen, der auch bis heute, also nach 3½ Jahren, noch nicht kristallisiert ist.

Bei einem Überblick über die in den vier Fraktionen enthaltenen Stickstoffmengen sieht man, daß die in den Fraktionen 2—4 enthaltene Stickstoffmenge von 7,29 g einer Argininmenge von 23,26 g entspricht (Arginin enthält 32,2% N). Kasein besitzt einen Arginingehalt von 3,8%; danach kämen auf 386 g unseres hydrolysierten Kasein nur 14,66 g Arginin (= 4,7 g N). Also ist in der Argininfraction mit Sicherheit eine Anreicherung von hasischem Stickstoff festzustellen. Das erklärt auch die ungemein schwere Kristallisierbarkeit des in dieser Fraktion steckenden Basengemisches.

In der Lysinfraktion, die 2,88 g N enthält, hat dagegen der Stickstoff abgenommen. Denn 386 g Kasein müßten bei einem Lysingehalt von 6% 23,16 g Lysin enthalten. Lysin besitzt 19,2% N, also kommen auf 23,16 g Lysin 4,44 g N. In unserer Lysinfraktion sind aber nur 2,88 g N enthalten.

Auf Grund dieser Berechnung darf angenommen werden, daß durch Anlagerung des Cyanamid an die freien  $NH_2$ -Gruppen des Lysin ein

Argininhomologes entstanden ist, das mit der Argininfraktion ausgefallen ist (vgl. dazu die Anlagerung von Cyanamid an Gelatine). Wenn es uns bis jetzt noch nicht gelang, dieses Homologe aufzufinden, so mag dies in erster Linie an der überaus schlechten Kristallisierfähigkeit dieser Substanz liegen. Dies haben zu ihrem Leidwesen auch bereits Winterstein und Heckel erfahren.<sup>1)</sup>

Einigermaßen auffallend war auf den ersten Blick, daß das iselierte Arginin racemisch war. Es ist aber durch Kossel und Weiß bekannt, daß die Arginuingruppe durch NaOH und Baryt innerhalb des Proteins leichter racemisiert wird, als im freien Zustand. Dakin und Dudloy erhielten durch 18–20 tagelanges Kochen von Kasein mit  $n/2$  NaOH eine totale Racemisierung aller drei Hexonbasen. In unserem Falle handelte es sich vielleicht um ähnliche Vorgänge, denn unser Kasein stand monatelang mit Ammoniak, und zwar mußte mehr Ammoniak als bei der analogen Aufarbeitung der Gelatine (s. unten) zugesetzt werden, damit das Kasein wenigstens in einem halbgelösten Zustande gehalten werden konnte.

Die Racemisierung hat uns sehr gestört, denn wir hatten gehofft, das natürliche d-Arginin mit Hilfe von Arginase aus der mit Silber fällbaren Fraktion entfernen zu können.

## Hydrolyse der Gelatine.

Die Hauptmenge der Cyanamidgelatine wird zu 5 l eisgekühltem 90%igen Alkohol in einen Rundkelben gegossen und zwei Tage stehen gelassen. Die Gelatine hat sich gut abgesetzt; der Alkohol wird durch Faltenfilter abfiltriert. Die zurückgebliebene bröcklige Gelatine wird drei Stunden mit 1 l 99%igen Alkohol auf dem Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt; der Alkohol wird dann abgegossen und eine Probe der Gelatine im Reagensglas mit Alkohol gekocht: der abfiltrierte Alkohol reagierte jetzt nicht mehr mit Silbernitrat und Ammoniak, ist also vom Cyanamid und Diätyldiamid befreit. Die Gelatine wiegt feucht 650 g; sie wird mit 1600 g Wasser und 750 g konzentrierter Schwefelsäure 20 Stunden hydrolysiert. Das heiße Hydrolysat wird so lange mit konzentrierter heißer Barytlösung versetzt, bis schwach kongosaure Reaktion eingetreten ist. Der massige Bariumsulfat-Niederschlag wird mehrmals mit Wasser ausgekocht. Die Filtrate des Bariumsulfat-Niederschlags werden im Vakuum auf 2000 cem eingengt.

<sup>1)</sup> Inzwischen haben wir uns durch die Synthese Impfkristalle besorgt.

Makro-Kjeldahl-Bestimmung in 1 cem des Hydrolysats = 26,32 mg N (zur Titration 18,8 cem  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  verbraucht). Im Hydrolysat sind also noch 52,64 g Stickstoff; dies entspricht 308 g Cyanamidgelatine. Berechnetes Ausgangsmaterial an Cyanamidgelatine ist 334 g, d. h. der Verlust durch das Hydrolysieren ist nicht größer als üblich.

Binret-Reaktion: —	Millon-Reaktion: —
Glyoxylsäure-Reaktion: —	Diazo-Reaktion: —
Jaffé-Reaktion: —	Weyl-Reaktion: —

### A.) Fällung mit flaviansaurem Natrium und Verarbeitung der Niederschläge.

In die kongosauro Lösung wird eine heiße Lösung von 12 g flaviansaurem Natrium in 100 cem Wasser hineinfiltrierte. Am nächsten Tag wird von dem gelben Niederschlag abgesaugt; er wiegt nach dem Trocknen bei 105° 15 g. Das Filtrat wird mit einer heißen, gesättigten wässerigen Lösung von 50 g flaviansaurem Natrium versetzt; nach 8 Tagen wird abgesaugt. Der abgesaugte Niederschlag wog nach dem Trocknen 49 g. Das Filtrat wird auf dem Wasserbade auf 1000 cem eingengt und hiernach mit einer heißen Lösung von 10 g flaviansaurem Natrium in 100 cem Wasser versetzt. Trotz häufigen Kratzens mit dem Glasstab tritt keine Kristallisation ein. Durch Abkühlen einer entnommenen Probe im Eiswasser werden Kristalle erhalten, die zum Impfen der Hauptmenge benutzt werden. Nach einigen Tagen fallen darin Kristalle, die nach dem Trocknen 29 g wogen.

Die beiden ersten Niederschläge (15 g und 49 g) sind gelbrot, der letzte ist gelbgrün gefärbt; sie werden in der Folge mit I, II, III, bezeichnet.

Proben derselben werden unkristallisiert, im Vakuum über  $P_2O_5$  und KOH bei 110° getrocknet und analysiert.

### Analysen

	I			II			III		
%C im Mittel	40,08	39,33	40,01	40,06	39,73	39,96	40,06	40,01	39,87
		39,81			39,92			39,98	
%H im Mittel	5,14	4,13	5,07	5,10	4,87	4,97	5,05	5,01	4,91
		4,78			4,98			4,99	
%N im Mittel	16,46	16,21	16,50	16,95	16,87	16,77	16,57	16,42	16,66
		16,39			16,86			16,55	

Es wurden also Werte gefunden, die mit Argininflavianat nur annähernd übereinstimmen; der Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt ist etwas höher, der Stickstoffgehalt niedriger als der theoretische Wert; er ist für Argininflavianat 39,33% C, 4,13% H, 17,21% N.

## Niederschlag I.

Durch Kochen mit 30%iger Schwefelsäure wird die Flaviansäure getrennt. Das Filtrat wird durch Baryt von der Schwefelsäure befreit; Leiten von Kohlensäure, Entfernen des überschüssigen Baryt und Einengen des Filtrates, sowie Versetzen mit Salpetersäure führt zu einer Ausbeute von 2,5 g einer schwach gelb gefärbten Substanz. Sie wird 80%igen heißem Alkohol umkristallisiert. Smp. 129°.

## Analyse.

e = 3,988 mg;	CO <sub>2</sub> = 4,330 mg;	H <sub>2</sub> O = 2,420 mg
ber. für C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> · HNO <sub>3</sub> · 1/2 H <sub>2</sub> O M. G. 246,2		
	29,27% C	6,55% H
gef.	29,61% C	6,79% H

Schmelzpunkt und Analyse der Substanz stimmen also auf neutrales Argininnitrat.

Aus der Mutterlauge dieses Nitrates wurde ein Pikrolonat hergestellt, den Smp. 225° hat.

## Analyse.

e = 3,898 mg;	CO <sub>2</sub> = 6,270 mg;	H <sub>2</sub> O = 1,81 mg
ber. für Argininpikrolonat C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> M.G. 438,3		
	43,84% C	5,02% H
gef.	43,88% C	5,19% H

Schmelzpunkt und Kohlenstoffgehalt stimmen auf Argininpikrolonat.

## Niederschlag II.

Durch Kochen mit 30%iger Schwefelsäure, Versetzen mit Baryt, Überführen in das Karbonat und dann in das Nitrat werden 5 g Rehausbeute erhalten. Nach dem Umkristallisieren aus 80%igem Alkohol erhält man eine Substanz, die weiß-gelblich gefärbt ist und bei 129° schmilzt.

### Analyse.

e = 4,14 mg;	CO <sub>2</sub> = 4,470 mg;	H <sub>2</sub> O = 2,940 mg
ber. für neutrales Argininnitrat M. G. 246, 2		
<chem>C6H14N4O2 . HNO3 . 1/2 H2O</chem>		
	29,27% C	6,55% H
gef.	29,46% C	6,73% H.

Smp. und Analyse stimmen auf neutrales Argininnitrat.

Die Mutterlauge wird in vier Fraktionen aufgearbeitet; sie zeigten selbst nach zwei- bis dreimonatlichem Stehen keine Neigung zur Kristallisation und bleiben sirupös. Eine Fraktion davon wird mit Kupferkarbonat und Wasser gekocht, das blaue Filtrat wird eingedunstet: auch hier bleibt nur ein Sirup zurück, der in Alkohol unlöslich ist. Das Kupfer wird daher wieder durch H<sub>2</sub>S entfernt und ein Pikrolonat hergestellt. Smp. 225°.

### Analyse.

e = 3,898 mg;	CO <sub>2</sub> = 6,27 mg;	H <sub>2</sub> O = 1,81 mg
ber. für Argininipikrolonolat M. G. 438,3		
	43,84% C	5,02% H
gef.	43,87% C	5,20% H

Der Smp. und die Kohlenwasserstoffbestimmungen dieses Pikrolonates stimmen auf das Pikrolonat des Arginin.

## Niederschlag III.

Er wird, wie bereits oben angegeben, mit Schwefelsäure zerlegt und in das Nitrat übergeführt. Aus dem braunen Sirup kristallisiert nach 10 Tagen 0,3 g einer weißen Substanz aus, die aus 85%igem Alkohol umkristallisiert wird.

### Analyse.

e = 4,50 mg;  $\text{CO}_2 = 5,215 \text{ mg}; \text{H}_2\text{O} = 2,750 \text{ m}$   
 gef. 31,61% C 6,85% H

e = 3,638 mg;  $\text{N}_2 = 0,57036 \text{ ccm}$   
 t = 22° b = 754 mm  
 gef. 18,0% N

Die Wiederholung der Analyse ergab das gleiche Ergebnis. Die Substanz muß sehr sauerstoffreich sein; es berechnet sich auf 1 N 1,614 C, 5,289 H und 2,229 O. Es ist also weder ein Arginin noch ein Lysin. Vielleicht sind bei der Überführung in das Nitrat durch die Behandlung mit Salpetersäure Oxydationsprodukte entstanden.

Aus der Mutterlauge wird über die Phosphorwolframsäurefällung ein Pikrolonat erhalten; ein Teil desselben ist in heißem Alkohol löslich. Hieraus kristallisiert ein Pikrolonat mit 18,32% N aus. Der in Alkohol unlösliche Teil hat 18,51% N.

### Analyse.

e = 3,803 mg;  $\text{N}_2 = 0,617 \text{ ccm}$   
 t = 24° b = 752 mm  
 gef. 17,84% N

e = 3,524 mg;  $\text{N}_2 = 0,584 \text{ ccm}$   
 t = 24° b = 748 mm  
 gef. 18,12% N

Es liegt also ein Produkt vor, das an Stickstoff ärmer ist als Arginin. Die Ausbeuten an dieser Substanz waren aber zu gering, als daß sie zur Identifizierung gereicht hätten. Wir haben deshalb die weitere Bearbeitung dieser Fragen für später zurückgestellt, besonders im Hinblick darauf, daß wir bereits im Besitze weiteren Ausgangsmaterials in Form einer mit Cyanamid behandelten Gelatine sind.

## B.) Fällung des Flavianatfiltrates mit Reinecke-Salz und Verarbeitung des Niederschlags.

Beyr ich zur Schilderung der Weiterverarbeitung der Gelatine übergebe, sei die Reinecke-Fällung von Basen beschrieben, die bei der Verarbeitung des Eiweißes in Betracht kommen können. Von deren Eigenschaften mußte der weitere Arbeitsgang abhängen.

Es leitete mich die Beobachtung von Christensen, wonach Reinecke-Säure

mit primären Aminen Salze gibt, die in warmem Wasser nicht, in wässrigem Alkohol leicht löslich sind,

mit sekundären Aminen, Salze, die in warmem Wasser schwer, in wässrigem Alkohol leicht löslich sind,

mit tertiären Aminen, Salze, die in warmem Wasser schwer, in wässrigem Alkohol schwer löslich sind.

Zur letzten Gruppe gehört auch das Guanidin. Merland's Salz, das bei der Darstellung des Reinecke-Salzes anfällt, ist in seiner Konstitution durch Werner als das Guanidin-Salz der Reinecke-Säure aufgeklärt worden. In naher Beziehung zum Guanidin steht das Kreatinin, das, wie Terada (noch nicht veröffentlichte Beobachtungen aus unserem Laboratorium) festgestellt hat, ebenfalls ein sehr schwer lösliches Reineckat gibt. Die Salze wurden durch doppelte Umsetzung der Ammonsalze der Reinecke-Säure in schwach kengosaurer Lösung erhalten. Die Reinecke-Säure selbst zersetzt sich nicht besonders leicht und bleibt im Wasser gelöst, so daß ein geringer Überschuß von Mineralsäure nichts schadet. Es wurden daher Guanidosäuren und Glykoeyamidine auf ihre Fällbarkeit durch die Reinecke-Säure geprüft. Außerdem wurde untersucht, inwieweit die Hexonbasen Histidin und Lysin, die ebenfalls noch im Filtrat der Flaviansäurefällung stecken, schwer lösliche Reineckate geben. Natürlich mußten auch  $\alpha$ -Aminosäuren in den Kreis der Untersuchungen gezogen werden.

Wie zu erwarten war, geben diese keine schwer löslichen Salze, auch nicht das Dipeptid Glycylglycin und die Hexonbasen. Das Reineckat des Arginin ist in wässrigem Alkohol leicht löslich.

Von den Eiweißbausteinen gibt allein Prolin ein schwer lösliches Salz. Oxyprolin stand mir nicht zur Verfügung.

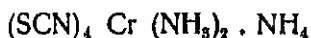


Fällungen gaben ebenfalls sämtliche untersuchte Glykocyamidine. Soweit mir die Aminosäuren und Halogenfettsäuren zur Verfügung gestanden haben, habe ich die entsprechenden Guanidosäuren und ihre Glykocyamidine eigens hergestellt und ihre Eigenschaften studiert. Wichtig war weiterhin, einen Weg zu finden, wodurch Reinecke-Salz wieder entfernt wird. Man könnte die Salze ansäuern und die komplexe Säure ähnlich wie die Phosphorwolframsäure mit Äther oder Amylalkohol extrahieren. Besonders Versuche haben ergeben, daß dieser Weg im Kleinen bei Reagenzglasproben gut gangbar ist, beim Arbeiten im Größeren zersetzt sich aber die Reinecke-Säure während der Aufarbeitung, so daß stets Chrom in der wässrigen Lösung bleibt. Bequem ist sie durch Überführung in ein schwer lösliches Salz zu entfernen. Die Erdalkalisalze erweisen sich hier im Gegensatz zur Phosphorwolframsäure als unbrauchbar; brauchbar sind Schwermetallsalze, vor allen Dingen Quecksilberchlorid, das sich ja auch in alkoholischer Lösung anwenden läßt. Im Filtrat vom Quecksilber-Reineckat entfernt man das überschüssige Quecksilber durch Schwefelwasserstoff und engt das Filtrat vom Quecksilbersulfid im Vakuum ein. Zurück bleibt das Chlorid der gewünschten Base. Unter Umständen ist es verunreinigt mit Ammoniumchlorid und Ammoniumrhodanid, wenn der Reinecke-Niederschlag nicht gründlichst ausgewaschen war, oder die Reinecke-Säure sich auch bei dieser Aufarbeitung etwas zersetzt hat. Von ersterem Salz trennt man durch Auskochen mit absolutem Alkohol; auch von der Löslichkeit der Chlorhydrate gewisser Basen in Chloroform kann man vorteilhaft Gebrauch machen.

Es fallen mit Reinecke-Salz: Bleiacetat, Silbernitrat, Kreatinin, Arginitrat (alkohollöslich), Glykocyamidin, Phenylglykocyamidin, Alakreatinin, Prolin, Flaviansäure, Glycylglycin, Lysin, Histidin, Glutaminsäure, Glykokoll, Alanin geben keine Fällung.

Ich lasse jetzt die Darstellung des Reinecke-Salzes folgen wie sie Christensen gegeben hat und beschreibe die Darstellung der hergestellten Reineckate des Prolin und der Glykocyamidine.

## Darstellung des Reinecke-Salzes.



200 g Ammoniumrhodanat werden in der Porzellanschale über einem kräftigen Bunsenbrenner geschmolzen; dann wird in möglichst kleinen Portionen 34 g fein gepulvertes Ammoniumbichromat zugegeben.

Die geschmolzene dunkelviolette Masse wird während des Abkühlens mit dem Glasstab gerührt. Ist sie völlig erkaltet, so wird sie im Mörser fein zerrieben, mit 150 ccm Wasser ausgelaugt und abgesaugt. Das Filtrat wird weggewaschen. Der Niederschlag wird in 400 ccm Wasser gebracht, auf 50° erwärmt und bei dieser Temperatur wird rasch abgesaugt. In dem eiskühlten Filtrat kristallisiert das Reinecke-Salz rasch aus. Um es vollkommen rein zu bekommen, muß es noch dreimal aus Wasser bei 50° umkristallisiert werden. Ausbeute etwa 15 g. Es kristallisiert mit einem Mol. Wasser, gibt aber selbst nach längerem Trocknen im Hochvakuum über  $P_2O_5$  und KOH bei 110° sein Kristallwasser nicht vollständig ab. Die Stickstoffbestimmung nach Dumas gibt keine befriedigenden Werte, wohl aber eignet sich die Kehlenwasserstoffbestimmung zur Analyse des Reinecke-Salzes. Die gefundenen Werte für Chrem sind in der Regel durchschnittlich um 0,1 bis 0,15% höher als die berechneten Werte.

### Analyse.

e = 4,686 mg	$CO_2 = 2,445$ mg	$H_2O = 1,440$ mg	$Cr_2O_3 = 1,084$ mg
ber. für $C_4H_{10}N_7S_4Cr$ M.G. 436,1			
	14,28% C	3,00% H	15,47% Cr
gef.	14,24% C	3,44% H	15,83% Cr

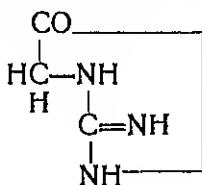
### Prolin-Reineckat.

0,12 g l-Prolin (1/100 Mol.) werden in 1 ccm Wasser gelöst und mit Salzsäure bis zur kengesauerten Reaktion angesäuert. In diese Lösung filtriert man eine warme gesättigte Reinecke-Salzlösung in geringem Überschuß. Die sofort entstandenen Kristalle werden abgesaugt, gewaschen und aus warmem Wasser umkristallisiert. Über  $P_2O_5$  und KOH bei 110° im Vakuum getrocknet beträgt die Ausbeute 0,35 g.

### Analyse.

e = 4,288 mg	$CO_2 = 3,185$ mg	$H_2O = 1,560$ mg	$Cr_2O_3 = 0,756$ mg
ber. für $C_9H_{14}N_7CrS_4O_2$ M. G. 434,48			
	11,96% Cr	24,87% C	3,71% H
gef.	12,06% Cr	24,65% C	4,07% H.

## Glykocyamidin—Reineckat.



0,7 g Glykocyamidinchlorhydrat wurden in 1 cem Wasser gelöst und 1,7 g Reinecke-Salz, das bei 55° in 75 g Wasser gelöst war, gefällt. Nach Waschen und Absaugen umkristallisieren und bei 110° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> im Vakuum trocknen. Die Substanz sintert bei 178° und zerfällt sich, ohne zu schmelzen bei 180°. Löslichkeit: 0,18 g in 100 Teilen Wasser bei 19°.

### Analyse.

e=6,460 mg CO<sub>2</sub>=4,680 mg H<sub>2</sub>O=1,700 mg Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>=1,27 mg

C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O S<sub>4</sub>Cr M. G. 418,46

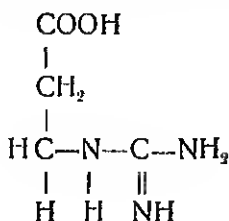
20,08% C 2,89% H 12,43% Cr

cl. 19,76% C 2,95% H 12,45% Cr

Die Löslichkeit wurde immer in der Weise bestimmt, daß eine aliquote Menge der Substanz 1 Stunde lang mit soviel Wasser bei 19° stehen blieb, bis ein ungelöster Bodensatz im Gefäß zurückblieb. Es wurde häufig mit Glasstab umgerührt. Dann wurde unter Verwerfen der ersten Teile Filtrats abfiltriert, eine aliquote Menge im Wägegöläschen gewogen, dem Wasserbad eingedampft, und nach dem Trocknen im Exsikkator Rückstand bestimmt.

## Alakreatinin-Reineckat.

### Darstellung der α-Guanidopropionsäure.



Die Darstellung erfolgt nach der von Ramsay angegebenen Verschrift. 10 g Guanidinkarbonat werden in verdünnter Schwefelsäure gelöst; nach der Verdünnung mit Wasser wird die Schwefelsäure mit Bariumhydrat quantitativ ausgefällt, und das Filtrat unter 12—15 mm Druck bis auf ungefähr 10 ccm eingengt. Diese Lösung enthält nach der Berechnung 6,56 freies Guanidin. Zu dieser Guanidinlösung gibt man tropfenweise unter Kühlung 3,4 g  $\alpha$ -Brompropionsäure; das Guanidinsalz fällt zuerst aus, löst sich allmählich beim Erwärmen auf 60°; nach 1½ bis 2 Stunden ist die Reaktion vollendet. Um das noch vorhandene Wasser zu entfernen, engt man die schwach gelb gefärbte Lösung bei einem Druck von etwa 14 mm bis zum Sirup ein. Die zähe Flüssigkeit wird nun mit 100 ccm absolutem Alkohol vermischt und 100 ccm Acetou zugefügt. Die Flüssigkeit trübt sich hierbei und nach einigen Stunden ist eine reichliche Kristallisation entstanden. Die Kristalle werden abgesaugt, mit kaltem Alkohol gewaschen und aus heißem Wasser mehrmals umkristallisiert. Die Ausbeute an reiner Substanz betrug 60% der Theorie.

## Darstellung des Alakreatinin—Reineckats.

(Methylglykocyamidin).

3 g der nach Ramsay hergestellten Guanidopropionsäure werden 6 Stunden lang mit 10 ccm 2/l n-Schwefelsäure am Rückflußkühler gekocht. Nach Verdünnen der Lösung mit Wasser wird die überschüssige Schwefelsäure durch Barytlösung entfernt. Das auf 50 ccm eingengte Filtrat wird bei schwach kongosaurer Reaktion mit einer 50° warmen Reinecke-Salzlösung gefällt. Von den Kristallen wird nach einer Stunde abgesaugt; sie werden mit kaltem Wasser gut gewaschen und im Exsikkator über KOH und Schwefelsäure getrocknet. Die Substanz sintert bei 160° und zersetzt sich bei 170°. Ausbeute etwa 10 g.

## Analyse.

e=	4,865 mg	CO <sub>2</sub> =	3,925 mg	H <sub>2</sub> O=	1,520 mg	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> =	0,907 mg
ber. für	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> O	S <sub>4</sub> Cr	M. G.	432,48			
	22,2%	C	3,26%	H	12,02%	Cr	
gef.	22,0%	C	3,50%	H	12,76%	Cr	

Löslichkeit: 0,52 g in 100 Teilen Wasser bei 18°.

## Kreatinin—Reineckat.

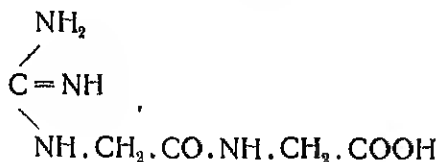
0,11 g Kreatinin (1/100 Mol.) wurden in 1 ccm Wasser gelöst und dazu soviel Salzsäure gegeben, bis kongesaurte Reaktionen eintrat. Die Lösung wird mit einer warmen Reinecke-Salzlösung (0,32g=1/100 Mol.) versetzt. Die Ausbeute nach dem Trocknen im Vakuum über  $P_2O_5$  und KOH bei  $10^\circ$  betrug 0,4 g. Zersetzungspunkt bei  $182^\circ$  nach vorherigem Sintern bei  $180^\circ$ . Die Löslichkeit beträgt 0,16 g in 100 Teilen Wasser (nach Terada, noch nicht veröffentlichte Arbeit aus unserem Laboratorium.)

### Analyse.

$d = 5,516$  mg  $H_2O = 1,760$  mg  $CO_2 = 4,505$  mg  $Cr_2O_3 = 1,015$  mg  
ber. M. G. 432,48  $C_4H_7N_6S_4Cr$

	22,20 % C	3,26 % H	12,02 % Cr
gef.	22,28 % C	3,55 % H	12,59 % Cr

## Glykocyamylglycin.



### A) Glycylglycin.

Als Ausgangsmaterial diente Glycinanhydrid, das aus Glycinesterchlorhydrat über den freien Glycinester (E. Fischer) hergestellt war. 10 g des feingepulverten Glycinanhydrid wurden mit der sechsfachen Gewichtsmenge rauchender Salzsäure schnell zum Sieden erhitzt und etwa 1 Minute im Sieden erhalten, wobei völlige Lösung eintrat. Beim raschen Abkühlen schied sich das Chlorhydrat des Glycylglycin als dicker Brei von Nadeln aus. Die Ausbeute betrug 60%. Zur Überführung in die freie Aminosäure wurde ein Teil des Salzes in 25 Teilen kalten Wassers gelöst und 0,8 Teile fein gepulvertes Silberoxyd zugefügt. Nach kräftigem Schütteln wurde von dem Chlorsilber abfiltriert und dasselbe mit lauwarmem Wasser gewaschen. Die Filtrate wurden mit Schwefelwasserstoff

vom Silber befreit, auf dem Wasserbad eingengt und in der Hitze mit Alkohol bis zur Trübung versetzt. Beim Abkühlen scheidet sich das Glycylglycin in perlmuttorglänzenden Blättchen ab; sie werden abgesaugt mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 100° getrocknet. Smp. zwischen 215 und 220°.

## B) Anlagerung von Cyanamid an Glycylglycin.

2,8 g Glycylglycin worden mit 10 ccm Wasser und 1 g Cyanamid mit einigen Tropfen Ammoniak mehrere Tage stehen gelassen. Man saugt dann von dem Kristallbrei, der das Anlagerungsprodukt darstellt, ab, wäscht mit Wasser und Alkohol und trocknet bei 100°. (Clementi). Ausbeute 1,5 g.

### Analyse.

e=4,501 mg;	CO <sub>2</sub> =5,720 mg;	H <sub>2</sub> O=2,550 mg
ber. für C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>	M. G. 162,1	34,46 % C 5,97 % H
gef.		34,64 % C 6,34 % H

## C) Hydrolyse des Glykocyamylglycin.

0,7 g des nach Clementi in der oben angegebenen Weise hergestellten Dipeptidderivates wurden mit 1 g konzentrierter Schwefelsäure und 2 g Wasser 10 Stunden lang unter Rückflußkühlung gekocht. Zum Hydrolysat wird dann soviel heiße Barytlösung gegeben, bis schwach kongosaure Reaktion eintritt. Das Filtrat wird auf 5 ccm eingengt und mit einem geringen Überschuß von warmer Reinecke-Salzlösung gefällt. Der bei 110° im Vakuum getrocknete Niederschlag wiegt 0,54 g. Sein Zersetzungspunkt liegt bei 180°.

Wenn eine vollständige Hydrolyse des Glykocyamylglycin eingetreten wäre und wenn die abgespaltene Guanidoessigsäure quantitativ in Glykocyamidin übergegangen wäre, so hätten wir statt der gefundenen 0,54 g des Reineckates 1,68 g Reineekat finden müssen. Das Filtrat der Reinecke-Fällung gab auf weiteren Zusatz an Reinecke-Salz keinen Niederschlag mehr.

Nach der Zerlegung des Filtrates durch Quecksilberchlorid und Schwefelwasserstoff gab der als Rückstand gebliebene Sirup durch vor-

sichtiges Aufnehmen mit verdünntem Alkohol eine reichliche Kristallbildung. Eine Probe dieser Kristalle in 4 Vol. %iger Schwefelsäure gelöst, gab mit PWS starke Fällung; dies weist auf die Gegenwart von Guanideessigsäure hin. Die Kristallmasse, die aus einem Gemisch von Guanideessigsäure und Glykokoll bestehen dürfte, wurde mit Kupferkarbonat und Wasser gekecht. Aus dem tiefblauen Filtrat wurde das Kupfersalz des Glykekells isoliert. Durch Umkristallisieren wurden 0,5 g analysenreines Glykokollkupfer erhalten; es wurde durch eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl als solches identifiziert.

Die Mutterlauge vom Glykekellkupfer wurde ebenfalls kjeldahlisiert. Verbrauch wurden 72 ccm n/10 Säure = 0,0908 g N. Dieser Wert entspricht 0,214 g Guanideessigsäure.

Bei der Hydrolyse des Dipeptidderivates spaltete sich also das Glykokoll quantitativ ab.

Das zweite Spaltstück, die Guanideessigsäure, ging durch das Kochen mit Schwefelsäure zu 50% in den Ringkörper, das Glykocyamidin, über, das als Reinecke-Salz isoliert werden konnte.

### Fällung des Hydrolysats mit Reinecke-Salz.

Das Filtrat der mit flaviansaurem Natrium erhaltenen Niederschläge war auf 600 ccm eingengt worden. Es hatte im Verlauf mehrerer Wochen während des Aufenthaltes im Eisschrank Kristalle abgesetzt. Diese wurden abgesaugt und mit verdünntem, eiskühlem Alkohol gewaschen. Sie bestanden größtenteils aus anorganischen Salzen (Natriumsulfat). Um diese abzutrennen, wurde die Kristallmasse in wenig Wasser gelöst und mit einem Überschuß von Kupferkarbonat 1 Stunde lang unter Rückflußkühlung gekecht. Das Filtrat wurde eingengt, die daraus gewonnenen Kristalle, die lufttrocken 2,3 g wogen, erwiesen sich als das Kupfersalz des Glykokoll.

Das schwefelsäure Hydrolysat wurde hierauf mit heißer Barytlösung versetzt, bis die Lösung schwach kongosaure reagierte. Nach dem Auskochen des Bariumsulfatniederschlags wurden die vereinigten Filtrate durch Eindampfen auf dem Wasserbad auf ein Vol. von 600 ccm gebracht. In die schwach kongosaure braungefärbte Lösung wird eine auf 55° erwärmte Lösung von 20 g Reinecke-Salz in 200 g Wasser hineinfiltrierte. Es entstand sofort eine flockige Fällung, die sich bald kristallinisch absetzte. Der Stutzen, in dem die Fällung ausgeführt wurde, wurde vier Stunden

lang ins Eis gestellt. Nach dem Absaugen des rötlichbraunen Niederschlags wurde in das Filtrat wieder eine warme Reinecke-Salzlösung hineinfiltrierte (25 g in 250 g Wasser gelöst). Es entstand eine braune schmierige Fällung; das Gefäß stand noch 12 Stunden im Eis. Dann wird der Niederschlag abgesaugt und gut gewaschen. Im Filtrat ist Reinecke-Salz noch im Überschuß, denn durch erneuten Zusatz von Reineckesalzlösung entstand keine Fällung mehr. Das Filtrat, dessen Volumen 1200 ccm beträgt, wird für die spätere Aufarbeitung bei Seite gestellt.

Die beiden mit Reinecke-Salz erhaltenen Niederschläge wurden im Exsikkator unter Ausschluß von Licht über Natronkalk und Schwefelsäure getrocknet. Der erste Niederschlag (I) wiegt 19 g. Er ist fein kristallinisch, rosarot gefärbt; sein Zersetzungspunkt liegt zwischen 160° und 165°. Eine Probe wird im Reagensglas unter Erwärmen in Wasser gelöst. Beim Abkühlen erfolgt nur ganz langsam die Absecheidung eines feinpulvrigen, anscheinend amorphem Niederschlages, der sich beim erneuten Erwärmen mit Wasser nicht mehr vollkommen löst. Die Hauptmenge des Niederschlags wird nun mit 200 g Wasser angerieben und auf 55° erwärmt. Von dem ungelöst gebliebenen Teil wird abgesaugt. Beim Abkühlen des Filtrates fallen Kristalle aus, die nach dem Trocknen 2,5 g (Nr. 1) wogen. Ihr Zersetzungspunkt liegt zwischen 155° und 160°. In das mit 500 ccm Wasser vermischte Filtrat wird der ungelöst gebliebene Teil der Fällung I gebracht. Beim Erwärmen auf 55° trat vollständige Lösung ein. Beim Kühlen in Eiswasser fielen Kristalle aus, deren Trockengewicht 7,5 g (Nr. 2) betrug. Ihr Zersetzungspunkt lag zwischen 155° und 160°. Gleicher Zersetzungspunkt beim Mischen mit einer Probe der Fällung Nr. 1.

I. Die beiden Niederschläge (2,5 g und 7,5 g) werden in gleicher Weise, jedoch getrennt, weiterverarbeitet: Nach dem Auflösen in 50%igem Alkohol wird mit einer gesättigten kalten alkoholischen Quecksilberchloridlösung gefällt und mit Wasser gewaschen. In dem schwach rosa gefärbten Filtrat wird das überschüssige Quecksilber mit Schwefelwasserstoff entfernt, das Filtrat vom Quecksilbersulfid wird schließlich im Vakuum bis zum Sirup eingeengt. Ebenso wird die Mutterlauge der beiden Niederschläge mit Quecksilberchlorid und Schwefelwasserstoff behandelt. In allen drei Fällen löste sich der zurückgebliebene braune Sirup leicht in absolutem Alkohol. Die alkoholischen Lösungen wurden in Glasschälchen gebracht und mehrere Tage im evakuierten Exsikkator über Calciumchlorid und Schwefelsäure aufbewahrt. Es entstanden in jedem der Schälchen



einige wenige Kristalle. An der Luft zerflossen sie. In dem aus der Mutterlauge entstandenen Sirup war die Kristallbildung am reichlichsten.

Dieser kristallhaltige Sirup der Mutterlauge wird mit eiskaltem absolutem Alkohol verrührt und rasch abgesaugt. Ausbeute nach dem Trocknen im Exsikkator über Calciumchlorid und Schwefelsäure 0,4 g; Smp. 150—152°. Umkristallisieren aus wenig heißem absolutem Alkohol unter nachfolgender Eiskühlung. Trocknen bei Zimmertemperatur im Vakuum über  $P_2O_5$  und KOH; Smp. 154°. Die Substanz ist sehr hygroskopisch, sie wird über  $P_2O_5$  und KOH bei 110° im Vakuum getrocknet; ihr Smp. blieb bei 154°. Zur Identifizierung der Substanz werden eine Formel-titration, eine van Slyke-Bestimmung, eine Chlorbestimmung, eine Kohlenwasserstoff-Bestimmung und je eine Stickstoff-Bestimmung nach Kjeldahl und nach Dumas ausgeführt.

### Analysen:

38,018 mg in 20 ccm Wasser gelöst und mit n/10 Natronlauge gegen Phenolphthalein titriert verbrauchten 1,47 ccm n/10 Natronlauge = 5,35 mg Salzsäure = 14,07% Chlor.

In der gleichen Lösung Fermoltitration nach Sörensen: Verbraucht 1,73 ccm n/10 Lauge = 2,422 mg N = 6,344% N.

In der gleichen Lösung wird der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Es wurden 2,82 ccm n/10 Säure verbraucht = 3,948 mg N = 10,39% N.

$$e = 5,849 \text{ mg; } N_2 = 0,51646 \text{ ccm}$$

$$t = 19^\circ \quad b = 756 \text{ mm}$$

$$\text{gef. } 10,27\% \text{ N.}$$

$$e = 4,55 \text{ mg} \quad CO_2 = 7,435 \text{ mg} \quad H_2O = 3,21 \text{ mg}$$

$$\text{gef. } 44,54\% \text{ C} \quad 7,89\% \text{ H}$$

$$e = 9,649 \text{ mg; } AgCl = 5,170 \text{ mg;}$$

$$\text{gef. } 13,46\% \text{ Cl} \quad (\text{unter Berücksichtigung eines Rückstandes von } 0,144 \text{ mg})$$

Wasserbestimmung: 20,483 mg verlieren nach 6-stündigem Aufenthalt im Vakuum bei 110° über  $P_2O_5$  und KOH 0,125 mg an Gewicht = 0,625% Wasser.

Mikro-van Slyke:  $e = 7,480 \text{ mg}$   $t = 19^\circ$   $b = 760 \text{ mm}$

Nach 10 Minuten langem Schütteln  $= 0,32 \text{ ccm N} = 0,23\% \text{ N}$

Kontrollversuch nach 10 Minuten langem Schütteln  $= 0,28 \text{ ccm N}$

Aus den Analysenwerten  $44,54\% \text{ C}$   $7,89\% \text{ H}$   $10,27\% \text{ N}$   $13,46\% \text{ Cl}$   
berechnet sich ein Atomverhältnis von



Das Molekulargewicht wurde wegen des vorhandenen Aschgehaltes nicht bestimmt.

Aus der alkalimetrischen Titration und aus der Chlorbestimmung berechnet sich auf ein Atom Stickstoff nur  $\frac{1}{2}$  Mol. Salzsäure. Das Prolinchlorhydrat ist im Schrifttum nicht beschrieben; unser Prolin (Sammlungspräparat) gab unter den gleichen Bedingungen, unter denen die obige Substanz getrocknet worden war, ein Chlorhydrat, dessen Salzsäuregehalt höher als ein halbes Äquivalent war.

In 20%iger Salzsäure, welche in 0,8948 g, 0,06636 g der Substanz gelöst enthielt (sp. G. 1,1076), war die Drehung bei  $19^\circ$  Natriumlicht  $3,50^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{19} = -45,76^\circ$$

E. Fischer gibt für  $[\alpha]_D^{20}$  unter den sonst gleichen Bedingungen  $-46,53^\circ$  an.

Die spezifische Drehung unserer Substanz stimmt ziemlich gut auf Prolin, der Salzsäuregehalt unseres Präparates beträgt aber nur so viel als Prolinchlorhydrat enthalten mußte. Es wäre also möglich, daß wir ein Dipeptid aus Prolin und Oxypmlin in den Händen hatten, dessen elementare Zusammensetzung die gleiche ist wie bei Prolin aber nur die Hälfte des Salzsäuregehaltes vom Prolinchlorhydrat erfordert. Ein solches Peptid ist noch nicht bekannt, das Anhydrid hat Dakin erhalten. Natürlich ist unser Präparat als Dipeptid noch nicht identifiziert. Die Annahme, daß es ein Dipeptid ist, würde mit der Schwerlöslichkeit des Reineckates übereinstimmen. Vor allem aber hat Dakin aus Gelatine, als er das Hydrolysat unter gewöhnlichem Druck mit Butylalkohol extrahierte, das Anhydrid eines Dipeptides von obiger Zusammensetzung erhalten und seinen Aufbau durch den quantitativen Spaltungsversuch bewiesen. Peptide können sich leicht durch siedenden Butylalkohol anhydrisieren; daß aber freies Prolin mit freiem Oxypmlin zu dem Anhydrid zusammengetreten ist, ist sehr unwahrscheinlich. Dafür, daß das Peptid

primär im Eiweiß vorgebildet ist, spricht die Übereinstimmung im Befunde Dakins mit dem unsrigen. Es wäre demnach ein solches Peptid besonders schwer spaltbar. Auch Prolylalanin wird durch rauchende Salzsäure nicht leicht gespalten (E. Fischer). Daß die tertiäre Bindung des Stickstoffatoms in dem einen Baustein eines Peptides auch oft zu anormaler Reaktionsweise führt, hat E. Fischer mit Reif und mit Glund gezeigt.

II. Der rosarot gefärbte Niederschlag der Fällung II wiegt nach dem Trocknen im Exsikkator (über Natronkalk und Schwefelsäure) 21 g. Er sintert bei 155° und zersetzt sich bei 165°.

Durch fraktionierte Kristallisation aus Wasser (bei 50°) wurden 6 Kristallfraktionen erhalten:

1.	4,0 g	Zersetzungspunkt	155—165°
2.	4,0 g	„ „	155—165°
3.	2,0 g	„ „	160°
4.	2,0 g	„ „	140—150°
5.	0,6 g	„ „	150—160°
6.	1,0 g	„ „	150—160°

13,6 g; es müssen also in der Mutterlauge (II) noch 7,0 g Reineckat stecken.

Die mit II bezeichnete Mutterlauge und die 6 Kristallfraktionen werden in der oben beschriebenen Weise mit Quecksilberchlorid und Schwefelwasserstoff behandelt und in die Chlorhydrate übergeführt. Die gelbbraunen sirupösen Rückstände zeigen während ihres mehrwöchentlichen Aufenthaltes im Vakuumexsikkator (über Schwefelsäure und KOH) nur Spuren von Kristallen. An die Luft gebracht zerfließen sie.

Der Rückstand aus der Mutterlauge II wird in der Annahme, daß ein Glykoeyamidinderivat vorliegt, mit Wasser und Zinkoxyd eine Stunde lang mit Rückflußkühlung gekocht. Die Filtrate vom überschüssigen Zinkoxyd werden zur Trockne gebracht und mehrmals mit Alkohol ausgekocht. Der jetzt verbliebene Rückstand enthält nur Spuren von Zink, woraus folgt, daß die fragliche Substanz kein Zinksalz gebildet hatte.

Die Fraktion 6 wurde mit wenig Wasser aufgenommen und durch zweistündiges Schütteln mit frisch gefälltem Silberoxyd von der Salzsäure befreit. Das vom Silber gereinigte Filtrat wird im Vakuum zur Trockne

gebracht, der Rückstand wird aus absolutem Alkohol umkristallisiert. Trocknen im Exsikkator über Calciumchlorid und Schwefelsäure; Smp. bei 218—220°. Die Kristalle, unter dem Polarisationsmikroskop betrachtet zeigen eine schiefe Auslöschung. Sie schmecken süß. In 4,6% iger wässriger Lösung dreht die Substanz das polarisierte Licht nach links.

$$[\alpha]_D^{180} = -74,64^\circ$$

Im Schrifttum wird die Drehung des l-Prolin mit  $-80^\circ$  angegeben.

### Analyse.

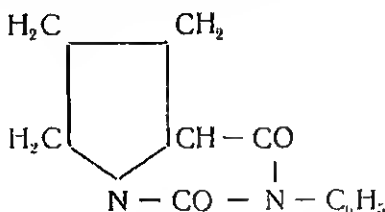
$$e = 5,190 \text{ mg; } \text{CO}_2 = 9,690 \text{ mg; } \text{H}_2\text{O} = 4,450 \text{ mg; } \\ 0,028 \text{ mg Rückstand} = 0,54\%$$

Ber. für Prolin $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ M.G. 115	•	52,2% C	7,8% H
gef. 50,93% C		8,27% H	50,93% C
			8,27% H

$$c = 8,486 \text{ mg; } \text{N}_2 = 0,88690 \text{ ccm } t = 21^\circ \text{ b} = 753 \text{ mm} \\ \text{ber. für Prolin M.G. 115} = 12,2\% \text{ N} \\ \text{gef. } 12,01\% \text{ N}$$

Es scheint also noch nicht ganz reines l-Prolin vorzuliegen. Damit stimmt der etwas zu niedrige Wert für  $[\alpha]_D$  überein\*).

Die zum Polarisieren benützte wässrige Lösung wurde mit Phenylisocyanat und Salzsäure in das Hydantoin übergeführt:



Es besitzt den Smp. 143° und stimmt damit mit dem von E. Fischer beschriebenen Prolin-Hydantoin überein.

Prolin ist ein Eiweißbaustein, den gerade die Gelatine in besonders großer Menge besitzt. Von den übrigen Aminosäuren unterscheidet es

\*) Anmerkung: Inzwischen ist es mir gelungen, die Methode so zu verbessern, daß die beiden Proteine in analysenreinem Zustand erhalten werden.

sich durch seine leichte Löslichkeit in absolutem Alkohol. Auf diese Weise läßt es sich von jenen trennen, aber nur mit großer Mühe ganz rein gewinnen. Da die Reineckesäure die Aminosäuren und Peptidanhidride nicht fällt, die das Rohprelin meist verunreinigen, so scheinen wir in ihr ein Mittel in die Hand bekommen zu haben, mit dem man Prolin und Oxyprolin isolieren kann. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung sind im Gange.

## Methyliertes Kasein.

Methylierte Eiweißkörper hat zuerst Skraup dargestellt. Die Untersuchungen sind etwa gleichzeitig zu Wien und in Heidelberg wieder aufgenommen worden. Skraup hat in alkoholischer Lösung mit Jodmethyl und Kalilauge gearbeitet. Geake und Nieronstein, Herzig und Landsteiner arbeiteten in äthorischer Lösung mit Diazomethan. Im Kossel'schen Institut wurde in wässrig-alkalischer Lösung mit Dimethylsulfat methyliert (Rogocinski, Edlbacher). Einzelne Gruppen verhalten sich bei verschiedenen Eiweißkörpern verschieden, wie die N-Methylbestimmungen und Formoltitrationen oder van Slyke-Bestimmungen im Hydrolysat und seinen Fraktionen zeigen; dann an ihnen und ihren Hydrolyseprodukten werden diese Stickstoffformen sowie die mit Sauerstoff verbundenen Methylgruppen in den einzelnen Fraktionen bestimmt, und die Werte in Beziehung zum Gesamtstickstoff der Fraktionen gebracht. Auch acetylierte (Troensegard) und desamidierte Proteine (Landsteiner) wurden methyliert. Trotzdem herrscht noch Unklarheit über den Verlauf der Methylierung. Edlbacher und Kessel halten dafür, daß nur wenige Aminogruppen, z. B. die endständige des Lysin, vollständig methyliert werden, während Herzig und Landsteiner glauben, daß auch der peptidgebundene Stickstoff monomethyliert wird. Zu einer sicheren Entscheidung haben die bisherigen Methoden der Untersuchung, die fast nur analytischer Art waren, nicht gereicht.

Wir glauben, die Frage dadurch weiter zu bringen, daß wir das methylierte und hydrolysierte Eiweiß verfütterten und die Methylprodukte aus dem Harn zu gewinnen suchten. Der Tierkörper verbrennt restlos sämtliche nichtmethylierte Aminosäuren. Im Harn erscheinen, wenn Edlbacher recht hat, Betaine, wenn Herzfeld und Langsteiner recht

haben Monomethylaminosäuren. Beide Körperklassen hesteben aus Vertretern, die für den Tierkörper schwer angreifbar sind und ihn unverändert durchlaufen. Dies haben Kutscher und Ackermann für die Betaine, E. Friedmann für die Methylaminosäuren bewiesen. Die Betaine lassen sich als schwach basische Substanzen aus dem Harn mit Phosphorwolframsäure ausfällen, die Monomethylaminosäuren würden im Filtrat davon stecken und sich wohl nach Aeylierung in Form von Säuren gewinnen lassen, die in Wasser schwer, in Äther leicht löslich sind.

Man könnte noch den Einwand machen, daß die schwerverhennlichen Produkte des Hydrolysats im Tierkörper noch nachträglich methyliert werden. Er kann dieses ja. Pyridin erscheint als Methylpyridiniumhydrochlorid im Harn (wie His gezeigt hat), und Nikotinsäure wird ebenfalls monomethyliert und geht in ihr Betain, das Trigonellin über (Ackermann). Diesen Einwand würden wir, mit diesem Beispiel nicht gelten lassen können, denn von dem tertiärgehundenen Stickstoff des Pyridin, der selbst Ringglied ist, ist ein anormales Verhalten nicht verwunderlich, und seine leichte Methylierbarkeit auch außerhalb des Tierkörpers bekannt. Der Tierkörper kann allerdings auch andere gewöhnliche Aminogruppen methylieren, wie aus der Bildung von Adrenalin hervorgeht. Doch ist dieses eine selten vollzogene Reaktion.

Monomethylaminosäuren würden die Formolzahl des Harns vermehren. Der formoltitrierbare Stickstoff beträgt etwa 2% vom Gesamtstickstoff des Harns bei normaler Ernährung. Eine Erhöhung kann aber auch auf Rechnung des optischen Antipoden der normalen nicht-methylierten Aminosäure zu setzen sein. Die Methylierung des Eiweißkörpers erfolgt ja in stark alkalischer Lösung. Wenn auch durch niedere Temperatur und möglichst rasches Arbeiten einer Razemisierung vorgeheugt wird, so ist doch unter diesen Bedingungen das Casein bereits derartig verändert worden, daß es seinen Phosphoranteil verlor. Eine Monomethylaminosäure oder der optische Antipode einer Aminosäure würde sich durch gleichzeitige van Slyke-Bestimmung und Sörensen-Titrationen nachweisen lassen.

Auch das phenolische Hydroxyl des Tyrosin wird bei der Methylierung verschlossen. Dies geht daraus hervor, daß im methylierten Casein die Millonsche Reaktion nicht mehr positiv ausfällt. Es ist allerdings kein sicherer Beweis für die Bildung einer Methoxylgruppe, wie Abderhalden kürzlich gezeigt hat. Dieses p-Methoxyphenylalanin würde uns aber nicht

stören, im Harn orscheint es nicht, da es leicht verbrönnlich ist. Von Dakin ist diese Substanz bereits verfüttert worden.

Auch die Diazoreaktion verschwindet bei der Methylierung des Casein. Ebonso wie die Acylierung nach Schotten-Baumann den Imidazolkern des Histidin, dessen Aminogruppe besetzt ist, aufspaltet, wird auch durch die Methylierung der Ring gespalten, wenn sein Stickstoff quaternäre Bindungen angenommen hat und dann mit Alkali erwärmt wird. Dies letztere hat Pinner bereits vor längerer Zeit gezeigt, die Aufspaltung bei der Acylierung hat Gerngroß dargetan. Das methylierte Histidin würde dann neben Ameisensäure und primären Basen ein Oxyderivat der Amino-n-valeriansäure geben. Über deren Verhalten im Tierkörper ist nichts bekannt.

### Bereitung des Ausgangsmaterials.

Sie erfolgte genau nach den Angaben von Edlbacher. Für den ersten Versuch wurde Casciu-Hammarston (von Kahlbaum) genommen und in Portionen von 200 g gearbeitet. Im zweiten Versuch wurde ein technisches Casein des Handels verwendet und in einer Charge 400 g Protein zu methylieren versucht. Dies erwies sich nicht als zweckmäßig. Man bleibt besser bei der Vorschrift von Edlbacher und arbeitet in kleineren Portionen; dadurch läuft die Reaktion rascher zu Ende, das Eiweiß läßt sich leichter nach dem Ausfällen auswaschen und wird also dem schädlichen Einfluß der Lauge schneller entzogen. Der erste Versuch wurde mit Unterstützung des Herrn Dr. Schliephake ausgeführt.

### Vorversuch mit methyliertem Casein.

Das Methylprodukt aus 200 g Casein wurde noch feucht mit Schwefelsäure hydrolysiert, die Schwefelsäure mit reinstem Baryt wieder annähernd entfernt, Filtrat und Waschwasser eingengt, bei ganz schwach saurer Reaktion gehalten und sorgfältig auf Freiheit von Barium geachtet. Diese Lösung hat ein Hund, der sonst nur Kartoffeln zu fressen bekam, unter sein Futter gemischt erhalten und ohne Schwierigkeit gefressen. Der Harn wurde einen Tag länger gesammelt, die einzelnen Tagesportionen gemischt, über Kieselgur filtriert und gemeinsam verarbeitet. Zuerst wurde nur die Hälfte des Harns in Arbeit genommen. Sie wurde auf etwa

ein Viertel konzentriert und bei starker schwefelsaurer Reaktion mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Die Fällung blieb über Nacht stehen, wurde dann abgesaugt, sorgfältig durch nochmaliges Verreiben mit schwefelsäurehaltigem Wasser ausgewaschen und in der üblichen Weise in Acetowasser mit Baryt zerlegt. Die Lösung der Karbonate wurde mit überschüssiger Salzsäure versetzt, im Vakuum zur Trockne gebracht, mehrmals mit absolutem Äthylalkohol ausgekocht, die alkoholischen Auszüge eingedampft und wieder mit Alkohol aufgenommen, und dies so lange fortgesetzt, bis die Lösung der Basenchloride frei von anorganischen Beimengungen war. Die hinreichend konzentrierte Lösung der Chloride blieb dann über gebranntem Kalk stehen, dabei schied sich ein feiner pulveriger Niederschlag ab, der abgesaugt mit wenig eiskaltem Alkohol gewaschen wurde. Er war hygroskopisch und wog nach dem Trocknen 1,2 g. Er wurde in etwa 50 ccm absolutem Alkohol verteilt und durch 2 ccm konzentrierte Salzsäure in Lösung gebracht, was aber erst nach weiterem Zusatz von 2 ccm Wasser gelang. Die klare Lösung wurde mit einer heiß gesättigten alkoholischen Lösung von Sublimat ausgefällt, indem etwa das gleiche Volumen von dieser zugegeben wurde. Es schied sich bald ein Öl ab, das mit Kristallen durchsetzt war und im Laufe von zwei Tagen ganz erstarrte. Es wurde dann abgesaugt, und der Niederschlag auf der Nutsche mit Alkohol gewaschen. Niederschlag und Filtrat wurden getrennt im heißen, salzsäurehaltigen Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Der überschüssige Schwefelwasserstoff wurde weggekocht und die Filtrate vom Schwefelquecksilber auf dem Wasserbade eingedunstet; die aus dem Sublimatniederschlag bereitete Lösung gab mit Goldchlorid eine Fällung. Sie wurde mit 10%iger Goldchloridlösung ausgefällt, die Fällung wog nach dem Trocknen (über Schwefelsäure mit Kalilauge) 2,35 g und schmolz bei 185—107°. Sie wurde aus 13 ccm zweifach normaler Salzsäure umkristallisiert; aus der heißen Lösung fällt sie zunächst ölig, um über Nacht kristallinisch zu erstarren. Die Kristalle bestehen aus recht großen flachen Platten und sehen einheitlich aus. Nach dem Umkristallisieren waren 1,96 g vorhanden, die zuerst bei Zimmertemperatur im Vakuum unter Schwefelsäure und Kalilauge, dann bei 80° über Phosphorpentoxid und Kaliumhydroxyd 3 Stunden getrocknet wurden. Sie zeigen dann bei 170° geringes Sintern, zersetzen sich bei 185° und sind bei 198° völlig zersetzt. Am Licht verfärben sie sich. Wegen der geringen Zersetzung und des unscharfen Schmelzpunktes wurde nochmals aus 3 ccm 2-n-Salzsäure umkristallisiert. Nach dem Absaugen und Trocknen, das immer unter



itabschluß geschah, wurden 1,011 g Kristalle erhalten, die bis zur Lichtskonstanz bei 80° getrocknet, nach 7 Stunden 1,89 % an Gewicht verloren haben. Sie dienten zur Analyse. Sie zeigen bei 125—130° geringes Erweichen und schmelzen bei 187—189° bei langsamem Erhitzen.

### Analyse.

e = 15,457 mg; 6,981 mg Au (Spur verspritzt)  
 6,998 mg CO<sub>2</sub>  
 3,392 mg H<sub>2</sub>O

für C<sub>9</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Au<sub>2</sub>Cl<sub>8</sub> M.G. 867,3

ber. 12,43% C 2,67% H 45,36% Au

gef. 12,35% C 2,46% H 45,17% Au

13,521 mg; 6,112 mg Au; 6,282 mg CO<sub>2</sub> 2,986 mg H<sub>2</sub>O  
 gef. 12,68% C 2,47% H 45,31% Au

e = 21,625 mg; 0,579 ccm N<sub>2</sub> t = 10° b = 758 mm

e = 15,875 mg; 0,426 ccm N<sub>2</sub> t = 13° b = 759 mm

ber. für C<sub>9</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Au<sub>2</sub>Cl<sub>8</sub> M.G. 867,3 3,22% N

gef. 3,22% N

3,20% N

Die Analyse stimmt also sehr gut auf das Halbbetain des Lysin, das an beiden basischen Gruppen die Goldchlorwasserstoffsäure (2 Mol.) gebunden hat.

Die aus dem Sublimatfiltrat bereitete Lösung gab starke Reaktion nach Jaffé und Weyl auf Kreatinin, das mit Zinkchlorid daraus bereitet wurde.

Die zweite Hälfte des Harns (1100 ccm), die mit Chloroform konzentriert war, wird nach Verjagen desselben mit 60 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 500 ccm 40%iger Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt, die Fällung auf die gleiche Weise verarbeitet, und die alkoholische Lösung der Chloride wiederum zwei bis drei Wochen im Exsikkator über brauntem Kalk stehen gelassen. Der pulverige Niederschlag wurde dieses Mal aber in etwa 20 ccm Wasser gelöst, ohne Zusatz von Salzsäure und mit einer heiß gesättigten wässrigen Lösung von Sublimat ausgefällt.

Am nächsten Tage wurde abgesaugt, die Fällung aber mit einer entsprechenden Fällung aus dem zweiten Versuch vereinigt und dort gemeinsam aufgearbeitet.

## Haupt-Versuch mit methyliertem Casein.

In Arbeit genommen wurden 800 g zur Methylierung. Die Ausbeute an methyliertem Protein betrug rund 550 g (trecken gerechnet). Es wurde wieder gleich hydrelsyiert und das an Schwefelsäure arme, an Barium freie Hydrelsyat 3 Tage lang an vier Hunde gefüttert. Der über Kieselgur filtrierte Harn wurde im Vakuum eingeeugt, was nur unter Zusatz von Maschinenöl möglich war. Zur Fällung wurden 1700 g Phosphorwolframsäure verbraucht, und der Niederschlag mit mehr als 5 kg Baryt (D. A. B. 5) zersetzt. Dies Zerlegen in Acetenwasser und das Auswaschen der Niederschläge dauerte zwei und einen halben Tag. Die Lösung der Karbonate wurde mit Salzsäure ganz schwach sauer gemacht (gegen Kenge) und dann im Vakuum zur Trecke eingedampft. Alkohol hat jetzt natürlich reichliche Mengen der Chloride von Barium, der Alkalien und von Ammoniak abgeschieden.

Das gereinigte alkoholische Filtrat bleibt bei entsprechender Konzentration 10 Tage über gebranntem Kalk stehen. Da die ölige Anscheidung nicht fest werden wollte, wurde salzsäurehaltiger Alkohol dazu gegeben und dann eine Kristallisation erreicht.

Das Chlorid 6,1 g wurde in Wasser gelöst und mit heißer, gesättigter, wässrig-alkoholischer Sublimatlösung gefällt. Beim Abkühlen kam ein rasch erstarrendes Öl heraus. Nachdem das Gemisch über Nacht in Eis gestanden, und weitere Zugabe von Sublimatlösung keine neue Fällung mehr gab, wurde abgesaugt, und der feucht 25 g wiegende Kristallbrei aus 20 g Wasser umkristallisiert. Das Filtrat wurde mit dem vorigen vereinigt. Niederschlag und Filtrat wurden dann wie im ersten Versuch mit Schwefelwasserstoff behandelt und das neue Filtrat eingeeugt.

Die Mutterlange des Chloridniederschlages von oben (6,1 g) wird mit alkoholischer Sublimatlösung ausgefällt, die halbweiche Fällung aus Wasser kristallisiert, und die aus dem Niederschlag bereitete Chloridlösung mit dem Filtrat b verarbeitet.

## Sublimatniederschlag A.

Beim Entquecksilbern ist durch Sprung des Kolbens ein Verlust eingetreten, und die wieder gesammelte Portion verunreinigt worden.

us den beiden getrennt verarbeiteten Lösungen wurden 4 Chloridfraktionen gewonnen, die nur ein leicht lösliches Chlaurat gaben, das sich Licht und beim Erwärmen zersetzte. Die Chloride erwiesen sich als reatinichlorid. Erhalten wurden 7,41 + 0,13 + 0,8 g.

### Analyse.

= 2,997 mg; 0,750 ccm N;  $t = 20^{\circ}$   $b = 759$  mm

= 60,256 mg; 4,047 ccm n/10 Ag; (nach Volhard)

für  $C_4H_7ON_3 \cdot HCl$  M.G. 149,5 ber. 28,13% N, 23,73% Cl  
gef. 28,35% N, 24,37% Cl

### Sublimatniederschlag B.

Mit dieser Fraktion wurde der entsprechende aus der zweiten Hälfte stammende Harn des ersten Versuches verarbeitet.

Die Chloride waren in absolutem Alkohol sehr leicht löslich. Ihre wässrige Lösung wird deswegen mit Natronlauge abgestumpft bis zur kongonegativen Reaktion und dann durch Eintragen von Natriumpikrat daran gesättigt. Es fällt ein öliges Niederschlag; er wird mit kalte gesättigter Natriumpikratlösung ausgekocht und nach dem Erkalten filtriert. Der jetzt fester gewordene Niederschlag wird nochmals mit einem Liter heißen Wassers unkristallisiert, er fällt wieder ölig, beginnt aber zu kristallisieren. Der Niederschlag wurde dann in Alkohol zerteilt (etwa 200 ccm 99% iger) und auf dem Wasserbad erwärmt, dabei löst er sich nur zum Teil. Es wird heiß filtriert, das Filtrat erstarrt beim Erkalten als sirupös und wird später kristallin. Beide Pikrate schmelzen unscharf bei  $65-70^{\circ}$ .

Das pikrinsäurehaltige Filtrat wird vorläufig zurückgestellt. Das in heißem Alkohol lösliche Pikrat I wiegt 4,93 g und enthält wenigstens 60% pikrinsäure.

Das in heißem Alkohol ungelöst gebliebene Pikrat II wiegt 19 g und enthält 62,6% Pikrinsäure.

Durch Zersetzen mit Salzsäure und Äthern werden Chloride erhalten, und daraus Chlaurate hergestellt, da die Lösung offenbar noch reatinin enthalten hat. Jaffé- und Weylsche Probe waren positiv.

Aus Pikrat I wurden folgende Chloraureate herausfraktioniert:

- Nr. 2 Rohgewicht 3,7 g; daraus gewonnen  
Nr. 2a 0,14 g Smp. 87—92°, beim Stehen am Licht zersetzt.  
Nr. 2h 0,71 g erweicht bei 45° und schmilzt vollständig bei 80°; 43,46% Au.  
Nr. 2e 0,92 g Smp. 45—50°, wie Zwirnfäden kristallisiert.  
Nr. 2d 0,59 g Smp. 50—52°, vom gleichen Aussehen 43,14% Au.  
Nr. 2c 0,67 g Smp. 55—65°, hygroskopisch, 42,9% Au.  
Nr. 3 2,364 g schmilzt bei 45—54°, zersetzt sich bei etwa 140°.  
Nr. 4 0,90 g schmilzt zwischen 65 und 90°, 42,6% Au.  
Nr. 5 1,38 g schmilzt zwischen 45 und 75°, 43,32% Au.  
Nr. 6 nicht kristallisierende Mutterlange.

Aus Pikrat II entsteht:

- Nr. 7 12,0 g schmilzt bei 45—57°, 42,8% Au.  
Nr. 8 2,03 g schmilzt bei 70—84°, 41,9% Au.  
Nr. 9 ein nur sehr schwer kristallisierendes Öl, aus dem noch 0,3 und 0,553 g ganz unscharf schmelzende Aurate vom gleichen Aussehen wie die verigen Fraktionen und einem Goldgehalt von 44,2 und 43,83% gewonnen werden konnten.

Die Aurate waren alle lichtempfindlich, hygroskopisch und konnten nicht bei höherer Temperatur trocken erhalten werden. Sie wurden deswegen im Wasser gelöst, mit Schwefelwasserstoff zersetzt und dabei die obigen Prozentzahlen für den Goldgehalt gewonnen. Sie beziehen sich also auf den Durchschnittsgoldgehalt der ganzen Fraktion.

Die Chloridlösung dunstete im Exsikkator ein und blieb auch nach längerem Stehen im Vakuum über Kalilauge sirupös. Nur in einzelnen Fraktionen setzte eine spärliche Kristallbildung ein. Es zeigte sich also der Goldgehalt in naher Übereinstimmung mit dem für das ebenfalls leicht lösliche Kreatininchloraurat berechneten von 43,5%.

Kreatinin gibt einen recht schwer löslichen Niederschlag mit der von Pauli empfohlenen Imidazoldikarbonsäure. Es wurden deswegen sämtliche Chloride mit Ausnahme des aus Nr. 5 bereiteten Chloraurats, das fast vollständig kristallinisch erstarrt war, in Wasser gelöst und die vereinigte Lösung, die etwa 6,2 g Chlorid enthalten mußte, mit Silberacetat entchlort, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entsilbert, im Vakuum unter Zusatz von Wasser so lange destilliert, bis alle überschüssige Essigsäure vertrieben war und diese Lösung dann mit einem Überschuß der Imidazol-



## Reineckat A.

Wird in heißem wässerigen Alkohol (je 250 cem) zerteilt und mit alkoholischer Sublimatlösung zerlegt. Das Gemisch wurde zur vollständigen Umsetzung mehrere Stunden in der Wärme gehalten. Aus dem Filtrat wird der Alkohol im Vakuum abdestilliert und dabei ein Niederschlag (weiße Kristalle) A1 erhalten. Die Quecksilberfällung des Reineckates wird nochmals mit warmem Wasser digeriert. Das Filtrat = A3. Sämtliche Fraktionen werden mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert, im Vakuum zur Trockne gebracht und mit sorgfältig getrocknetem Chloroform ausgezogen.

Die Analyse des Reineckates hatte keine Werte gegeben, die auf eine bestimmte Substanz schließen ließen. Am besten paßte noch Dimethylamin oder Trimethylamin, d. h. eine sauerstofffreie Base. Dazu würde auch die schwere Löslichkeit des Reineckates passen; deren Chloride sind in Chloroform löslich. In das Chloroform gingen aber nur sehr geringe Substanzmengen, die zu einer Identifizierung nicht ausreichten.

Die Hauptmenge der Chloride ist in Alkohol auch in der Kälte leicht löslich. Nach wochenlangem Stehen scheidet sich ein wenig Salmiak aus, von dem abfiltriert wird. Die Lösung enthält aber außerdem noch Spuren von Chrom. Der Alkohol wird verdunstet, die zurückbleibende wässerige Lösung mit PWS in Schwefelsäure gefällt. Die Fällung wird in Acetonwasser zerteilt und mit Baryt zerlegt, wobei ein basisches, ammoniakalisch riechendes Gas entweicht. Das barytalkalische Filtrat wird mit Salzsäure kongosauer gemacht und eingengt, desgleichen die Salzsäure, die beim Absaugen der barytalkalischen Lösung zwischen Saugflasche und Pumpe eingeschaltet worden war. Der Rückstand enthielt wenig  $\text{BaCl}_2$  und viel  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; er wurde mit Chloroform behandelt, das aber nur so geringe Spuren löste, daß deren Identifizierung unmöglich war. Di- oder Trimethylaminchlorid war also nicht vorhanden. Der Rückstand wurde dann mit absolutem Methylalkohol behandelt, der etwas Ammoniumchlorid herauslöste, das durch seine Überfällung in das Platinat als solches bestimmt wurde. Auch eine nochmalige Extraktion der Reineckatfällung mit heißem, wässerigen Alkohol ergab Ammoniak, keine kohlenstoffhaltige Base.

## Reineckat—Mutterlauge B.

Sie wird mit Natronlauge unter Zugabe von Ammoniumchlorid kurz aufgeköcht und dadurch das überschüssige Reineckat zersetzt. Vom Kaliumhydroxyd wird abfiltriert, das Filtrat mit Salzsäure übersäuert und im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird in absolutem Alkohol ausgekocht und diese Behandlung zur Entfernung der anorganischen Chloride wiederholt.

Der Chloridrückstand gibt beim Voraschen nur Spuren von Kohle. Das alkoholische Filtrat enthält Schwefel, offenbar also Salze der Thioharnwasserstoffsäure, die bei der Zersetzung des Reineckatesalzes frei geworden ist. Deshalb wird nach Entfernung des Alkohols mit Phosphorwolframsäure gefällt und aus dem Niederschlag in üblicher Weise über das Kaliumcarbonat das Chlorid bereitet, das mit Goldchlorid eine Fällung gibt.

Das rohe Chloraurat wog 1,65 g. Es wurde mit 28,5 ccm Salzsäure (1:1) umkristallisiert und im Dunklen im Exsikkator über Schwefelsäure und Kaliumhydroxyd eingedunstet.

Aus der eingedunsteten ersten Mutterlauge wird das überschüssige Goldchlorid mit Äther herausgewaschen und so noch eine zweite Portion Chloraurat II erhalten.

Chloraurat I (1,032 g) schmilzt zwischen 90 und 92°, enthält kein Kristallwasser. Zur Analyse wird im Hochvakuum und im Dunklen über Kaliumhydroxyd bei Zimmertemperatur getrocknet.

### Analyse.

ber. e = 10,450 mg 12,530 mg Ag Cl  
e = 8,820 mg 10,710 mg Ag Cl 3,660 mg Au (Schiffchen umgefallen)  
r  $C_5H_{13}O_3NH$  Au  $Cl_4$  M.G. 475,2  
ber. 2,56% H 12,68% C 2,96% N 41,68 Au  
30,01% Cl  
gef. 1) 29,66% Cl  
2) 30,04% Cl 41,5% Au

Das Aurat war im Dunkeln im Exsikkator aufgehoben worden. Trotzdem hatte es sich verfärbt. Es wurde daher nochmals aus verdünnter Salzsäure umkristallisiert und wieder im Vakuum über KOH und  $P_2O_5$  bei Zimmertemperatur getrocknet. Smp. 89—91,5°, nach weiterem Stehen im Exsikkator 86—87°. Die Analyse ergab jetzt folgende Werte:

## Analyse.

1) e = 12,020 mg;	5,980 mg CO <sub>2</sub> ;	2,790 mg H <sub>2</sub> O	5,190 mg Au
2) e = 12,710 "	6,300 " "	3,120 " "	5,495 " "
3) e = 14,020 mg	0,393 ccm N <sub>2</sub>	t = 21°	b = 748 mm
für C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> N. H Au Cl <sub>4</sub> M. G. 457,2			
ber. 13,13% C	2,64% H	3,06% N	43,14% Au
gef. 13,57	2,60	3,11	43,18
13,52	2,75		43,23

Das erste Aurat enthält also die Elemente eines Molekül Wassers mehr, als das zweite Aurat. Dieses Verhalten entspricht dem Aurat der  $\delta$ -Aminovaleriansäure, das auch den hier beobachteten Schmelzpunkt besitzt. Durch die Freundlichkeit von Herrn Prof. Ackermann, Würzburg, erhielt ich Aurat der  $\delta$ -Aminovaleriansäure vom Smp. 86 — 88°; mit meinem Aurat gemischt schmolz es bei 86–88°, zeigte also keine Depression. Es ist also gelungen, eine kleine Menge  $\delta$ -Aminovaleriansäure aus dem Harn zu isolieren.

Dieses Aporrhagma haben Salkowski bei der Fäulnis verschiedener Proteine, Ackermann bei der Fäulnis von Prolin und Arginin erhalten.

Auch hier ist es wohl durch die Fäulnis im Darm entstanden und nicht im Casein primär vorgebildet gewesen. Dadurch, daß die Hunde mit dem Gemisch der freien Aminosäuren gefüttert worden sind, waren unphysiologische Verhältnisse geschaffen. Normalerweise würde das freiwerdende Arginin (oder Argininpeptid s. Felix) sofort verarbeitet werden. Hier blieb aber ein Teil zeitweise im Darm, dem Angriff der Fäulniskeime zugänglich, liegen, weil nicht rasch genug resorbiert werden konnte.

Chloraurat II (0,882 g) beginnt bei 106° zu sintern und schmilzt unscharf von 112–120°. Die Analyse ergab 11,26 und 11,25% C; 2,85 und 2,71% N; 49,45 und 49,04% Au. Der hohe Goldgehalt war z. T. durch Ausscheidung von kristallisiertem Metall bedingt, das durch Reduktion entstanden war und mikroskopisch leicht nachzuweisen war. Es wurde daher nochmals aus wenig verdünnter Salzsäure umkristallisiert.

Aurat II besteht jetzt aus sehr kleinen büschelförmig angeordneten Nadeln, die optisch positiv sind und in der Richtung der Längsaxe auslösen. Erhalten wurden 8 egr, die im Gegensatz zu Aurat I nicht lichtempfindlich sind. Nach dem Trocknen im Vakuum über Calciumoxyd schmelzen sie unscharf bei 143–145°.



### Analyse.

1) e = 12,103 mg;	6,080 mg CO <sub>2</sub> ;	2,930 mg H <sub>2</sub> O	5,383 mg Au;
2) e = 16,000	8,020	4,030	7,125
für C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ON·HAuCl <sub>4</sub> M.G. 441,15			
ber. 13,60% C	2,74% H	44,70% Au	
gef. 13,70	2,71	44,48	
13,68	2,81	44,53	

Die zweite Form des Aurats der  $\delta$ -Aminovaleriansäure liegt also nicht vor, vielleicht aber ihr Anhydrid, das Piperidon; das Aurat davon ist nicht bekannt, könnte aber ebenso, wie das anderer Säureamide z. B. von Acetamid, existenzfähig sein.

Das Chlorid, das aus Aurat Nr. 5 (s. S. 59) erhalten wurde und kristallinisch erstarrte, wog 0,1 g; in trockenem Chloroform löste es sich nicht, durch Umkristallisieren aus Alkohol, Alkohol-Chloroform ließ es sich nicht reinigen; es wurde daher in das Platinat verwandelt. Erhalten wurden

### Analyse.

e = 4,5848 mg;	4,495 mg CO <sub>2</sub> ;	1,930 mg H <sub>2</sub> O	1,098 mg Pt
gef. 26,96% C	4,75% H	24,14% Pt	

Daraus berechnet sich ein Atomverhältnis Pt:C:H = 1:18,1:38,1. Es könnte also das Halbbetain des Lysin vorliegen.

ber.	(C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	PtCl <sub>6</sub>	M.G. 792,35
ber.	22,72% C	6,10% H	24,63% Pt	
ber.	(C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> ON <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	PtCl <sub>6</sub>	M. G. 756,32
ber.	23,80% C	5,33% H	25,80% Pt	

In der Mutterlauge steckte wiederum Calciumchlorid, weitere organische Basen ließen sich nicht herausarbeiten.

### Das Filtrat der Phosphorwolframsäure—Fällung.

Hier mußten die Monomethylaminosäuren gesucht werden. In üblicher Weise wurde durch Baryt und Kohlensäure das Fällungsmittel und der überschüssige Baryt entfernt. Das Filtrat verbrauchte etwa

10 ccm 2/1 n Natronlauge bis zur schwachen Rotfärbung von Phenolphthalein. Es wurde dann im Vakuum zur Trockne gebracht und mit 200 ccm absolutem Alkohol der Rückstand aufgenommen, der sich darin in der Wärme fast ganz löste. Beim Erkalten kristallisierte Harnstoff aus. Die Lösung wird abgegossen und der Kolbenrückstand nochmals mit 200 ccm absolutem Alkohol aufgenommen und dies vielfach wiederholt, bis beim Abkühlen aus dem alkoholischen Filtrat nichts mehr auskristallisiert.

Aus den alkoholischen Mutterlaugen konnte nur Harnstoff und ein wenig Kochsalz gewonnen werden. Sie wurden sämtlich, nachdem sie über ein Jahr zur Kristallisation gestanden hatten, bis auf den letzten Rest durchuntersucht.

Der in Alkohol unlösliche Rückstand wird mit wässriger Salzsäure in Lösung gebracht, die Lösung wieder getrocknet und mit absolutem Alkohol die anorganischen Chloride abgetrennt. Die alkoholische Lösung wird mit Bleioxyd und Silberkarbonat entchlort, im Vakuum eingengt, der Rückstand mit Alkohol in Lösung gebracht und einen Monat lang über gebranntem Kalk stehen gelassen. Es scheiden sich 0,9 g Allantoin aus.

### Analyse.

$e = 3,529$  mg;  $1,100$  ccm  $N_2$ ;  $t = 23^\circ$   $b = 759$  mm

für  $C_4H_6O_3N_4$  M.G. 158 ber. 35,4% N;

gef. 35,18% N;

Es lassen sich auch aus der Mutterlauge davon keine Aminosäuren isolieren, sie gibt mit Kupferkarbonat keine blaue Lösung.

Die alkoholische Mutterlauge vom Allantoin und die Waschkohole werden ebenfalls in gleicher Weise durchuntersucht. Außer einer kleinen Menge Harnstoff und 6 cg Allantoin haben sie nichts ergeben. Monomethylaminosäuren sind also bei der Methylierung vom Casein nicht entstanden.

## Zusammenfassung.

1. Der Prelylexyprolin- oder Oxyprolylprolin-Komplex ist in der Gelatine vorgebildet.
2. Ein Teil des Lysin der Gelatine und des Kasein hat eine Amino-  
gruppe frei.
3. Die Aminogruppen auch noch anderer, hier nicht genannter Bausteine scheinen unbesetzt zu sein, die Bausteine also am Ende einer Peptidkette zu stehen.



Mittel zur Durchführung dieser Arbeit und zu ihrer Drucklegung verdanke ich der Reekefeller-Foundation, der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft, der Vereinigung von Förderern und Freunden der Universität Leipzig und der August Stern-Siftung. Es ist mir eine angenehme Pflicht, den Genannten auch an dieser Stelle meinen besten Dank auszusprechen.

## SCHRIFTTUM

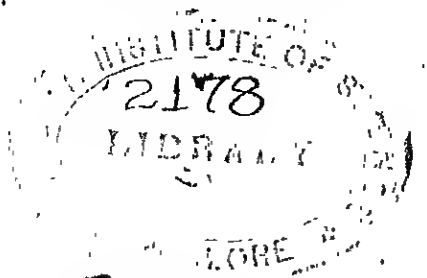
- E. Abderhalden*, Naturwissensch. 1924, S. 716; 1925, S. 999.  
H. S.\* 129, 106 (1923), Weitere Studien über den stufenweisen weiteren Abbau von Eiweißstoffen.
- E. Abderhalden u. E. Klarmann*, H. S. 135, 199 (1924), II. Mitt. Fortges. Versuche über die Darst. von Verbindungen von Diketopiperazinen mit Aminosäuren bzw. Polypeptiden. H. S. 139, 64 (1924) III. Mitt.
- E. Abderhalden, E. Klarmann u. E. Schwab*, H. S. 135, 180 (1924) Studien zur Überführung von Diketopiperazinen in die entsprechende Piperazine.
- E. Abderhalden, E. Klarmann und E. Kohn*, H. S. 140, 92 (1924), Weitere Studien über die Struktur des Eiweißmoleküls.
- E. Abderhalden u. E. Kohn*, H. S. 134, 113 u. 121 (1924), Studien über die Struktur des Eiweißmoleküls. H. S. 139, 147, (1924), Über die Entstehung von Diketopiperazinen aus Polypeptiden unter verschiedenen Bedingungen. H. S. 139, 181 (1924), Über die Anhydridstruktur der Proteine. H. S. 140, 99 (1924). Über die Anhydridstruktur der Proteine.
- E. Abderhalden u. E. Schwab*, H. S. 139, 68 (1924), Weitere Studien über die Struktur des Eiweißmoleküls. H. S. 139, 169 (1924), Über die Anhydridstruktur des Seidenfibrins.
- F. Abderhalden u. W. Stiv*, H. S. 129, 143 (1924), Weiterer Beitrag zu Konstitution der Proteine. H. S. 132, 238 (1924), Weitere Studien über die Struktur des Eiweißmoleküls.
- D. Ackermann u. F. Kutscher*, Zeitschrift für Biologie 72, 177 (1920), Über einige methylierte Aminosäuren und methylierte Aporrhegmen, sowie ihr Verhalten im Tierkörper.
- E. Bamberger u. B. Berlé*, Liebigs Annalen 273, 342 (1893), Aufspaltung des Imidazolringes.
- F. Baum*, Biochem. Zeitschr. 26, 325 (1910), Über eine einfache Darstellung von reinem Cyanamid.
- Baumann*, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 6, 1371 (1873).
- M. Bergmann u. A. Mickleley*, H. S. 140, 128 (1924), Umlagerung peptidähnlicher Stoffe. 3. Mitt.
- M. Bergmann*, Naturwissensch. 1924, S. 1155 u. 1925, S. 1045.
- F. Blum u. Th. Umbach*, H. S. 88, 285 (1913), Über Benzoylverbindungen von Eiweißkörpern.

\*) Hoppe-Seyler Zeitschrift für physiol. Chemie.

- Brigl, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 56, 1887 (1923), Zur katalytischen Spaltung von Eiweißstoffen nach Ssadikow und Zefinsky.
- Clementi, Gazz. chim. ital. 45, 1. 56 (1915). (Chem. Zentralblatt 1915 I, 1110.)
- Christensen, Journ. f. prakt. Chemie 45, 356 (1892), Beiträge zur Chemie der Chromammoniakverbindungen IV.
- Eidbacher, H. S. 107, 52 (1919.) Über die freien Aminogruppen der Eiweißkörper, I. Mitt. — H. S. 108, 287 (1919) II. Mitt. — H. S. 110, 153 (1920) III. Mitt. — H. S. 112, 80 (1920).
- Felix, H. S. 110, 217 (1920), Über die Beziehung der freien Aminogruppen zum Lysingehalt der Proteine.
- Berichte für die ges. Physiol. und experim. Pharmacol. 32, 691, (1926), Die Wirkung von Pepsinsalzsäure auf das Histone der Thymusdrüse.
- Fischer, H. S. 33, 151 (1901), Über die Hydrolyse des Kaseins durch Salzsäure. Berichte der Deutschen Chem. Ges. 39, 530 (1906), Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine.
- Fischer u. G. Reif, Liebigs Annalen 363, 118 (1908), 2. Derivate des Prolins.
- Fischer u. W. Glund, Liebigs Annalen 369, 247 (1909), Synthese von Polypeptiden.
- Foreman, Biochem. Journal 14, 451 (1920).
- Fränkel, Hofmeisters Beiträge 8, 156 (1906), Abbau des Histidin.
- Gammi, Dissertation Basel 1919.
- Friedmann, Hofmeisters Beiträge 11, 158, 177 und 194 (1908), Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.
- Geake u. M. Nierenstein, H. S. 92, 148 (1914), Zur Kenntnis der Aminosäuren, I. Mitt.
- Gerngross, H. S. 108, 50 (1919), Über Benzoylderivate des Histidin und Histamin.
- Hahn u. Meyer, Zeitschr. f. Biol. 78, 92 (1923).
- Heckel, Monatshefte für Chemie 29, 779 (1908), Synthese der  $\alpha$ - $\omega$ -Amino-guanidinkapronsäuren.
- Herzig, H. S. 111, 223 (1920), Zur Methylierung der Eiweißstoffe.
- Herzig u. K. Landsteiner, Biochem. Zeitschr. 61, 458 (1914), Über die Methylierung von Eiweißstoffen.
- Biochem. Zeitschr. 67, 334 (1914), Über die Einwirkung von alkoholischen Säuren auf Eiweißstoffe.
- Herzig u. H. Lieb, H. S. 117, 1 (1921), Über die Desaminoproteine.
- Hirayama, H. S. 59, 285 (1909), Über die Einwirkung einiger Säurechloride auf Protamine.
- Kossel u. S. Eidbacher, H. S. 93, 396 (1914/15), Einige Bemerkungen über das Histidin.
- H. S. 110, 241 (1920), Über die Trennung von Histidin und Arginin.
- Kossel u. N. Gawrilow, H. S. 81, 276 (1912), Weitere Unters. über die freien Aminogruppen der Proteinstoffe.
- Kossel u. R. E. Groß, H. S. 135, 167 (1924), Über die Darstellung und quantitative Bestimmung des Arginin.
- Kossel u. F. Weiß, H. S. 59, 492 (1909) und H. S. 60, 311 (1909), Über die Einwirkung von Alkalien auf Proteinstoffe.

- W. Loeffler u. K. Spiro, *Helv. chim. act.* 2, 533 (1919), Über Wasserstoff- und Hydroxylion-Gleichgewicht in Lösungen.
- K. Laadsteiner u. E. Prásek, *Biochem. Zeitschr.* 74, 388 (1916), Über acetylierte Eiweißkörper.
- F. Lieber, *Biochem. Zeitschr.* 145, 535 und 555 (1914), Über die Nitrierung einiger Eiweißkörper.
- H. Pauly u. E. Ludwig, *H. S.* 121, 165 (1922), Imdazolidinkarbonsäure zur Kennzeichnung und Trennung von organischen Basen.
- P. Pfeiffer u. O. Angera, *H. S.* 143, 265 (1925) Molekülverbindungen der Aminosäuren und Diazirperazine.
- A. Planer u. R. Schwarz, *Berichte d. Deutsch. Chem. Ges.* 35, 2457 (1902), Über Pilocarpin.
- H. Ramsay, *Berichte d. Deutsch. Chem. Ges.* 41, 4385 (1908), Neue Darstellung der Glykocyamine oder Guanidosäuren.
- O. Riesser *H. S.* 49, 210 (1906), Zur Kenntnis der optischen Isomeren des Arginin und Ornithin.
- S. B. Schryver, H. W. Buston u. J. H. Mukherjee, *Chem. Zentralbl.* 1925, II, 402.
- F. Rogozinski, *H. S.* 80, 371 (1912), Zur Methylierung des Clupein.
- T. Sasaki, *Biochem. Zeitschr.* 114, 63 (1921), Über eine Farbenreaktion von Glycinanhydrid und der Dipeptidanhydride, welche eine Glycylkomponente in sich schließen.
- M. Siegfried, *Parallele Eiweißhydrolyse*, Verlag Bornträger 1916.
- Zd. H. Skraup, *Monatshefte für Chemie*, 27, 453 (1906), Über das Desaminoglutin.
- Zd. H. Skraup u. B. Böttcher, Über die Methylierung der Gelatine, *Sitzungsberichte der Kais. Akademie der Wissensch. zu Wien*, 119, Abt. II b. 851 (1910).
- Zd. H. Skraup u. Ph. Hoernes, Über das Desaminokasein, ebendort 115, Abt. II b, 431 (1906).
- Zd. H. Skraup u. E. Krause, Über die Einwirkung von Jodäthyl auf Kasein, *Monatshefte f. Chemie* 30, 447 (1909).
- D. D. van Slyke, *Berichte d. Deutsch. Chem. Ges.* 43, 3170 (1910), Eine Methode zur quantitat. Bestimmung der aliphatischen Aminogruppen.
- S. P. L. Soerensen, *Biochem. Zeitschr.* 7, 45 (1907) Enzymstudien.
- Biochem. Zeitschr.* 25, 1 (1910), Bemerkungen über die Formoltitrierung, insbesondere über die Anwendung von ... -lange oder Barytlange bei derselben.
- H. S.* 106, 1 (1919), Pilocarpin.
- W. S. Ssadiow, *Biochem. Zeitschr.* 143, 504 (1923), Über die Kohlensäurebildung bei Spaltung der Eiweißstoffe im Autoklaven.
- Biochem. Zeitschr.* 147, 30 (1924), Über einige Produkte der katalytischen Spaltung des Roßhantres.
- W. S. Ssadiow u. N. D. Zelinsky, *Biochem. Zeitschr.* 136, 241 (1923), Über Produkte der katalytischen Spaltung von Eiweißstoffen.
- Biochem. Zeitschr.* 147, 30 (1924), Über Produkte der katalytischen Spaltung von Oänsedern.
- Strecker, *Compt. rend.* 52, 1212, (1861).
- N. Troensegaard, *H. S.* 112, 86 (1920), Nachweis von Pyrrolkörpern in den Proteinstoffen.

- Troensegaard*, H. S. 127, 137 (1923), Untersuchungen über die Zusammensetzung der Proteinstoffe, II. Mitt.  
H. S. 130, 84 (1923), Über Oxypyrrrole in Proteinstoffen.  
H. S. 134, 100 (1924), Über den reduktiven Abbau der Proteine und die Giftigkeit der Spaltprodukte (5. Mitt.)  
*Troensegaard u. J. Schmidt*, H. S. 133, 116 (1924), Untersuchungen über die Zusammensetzung der Proteine.  
*Waldschmidt-Letz u. A. Schöffner*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 58, 1356 (1925), Über die Bedeutung der Diketopiperazine für den Aufbau der Proteine. (Erste Mitteilung zur Spezifität tierischer Proteasen.)  
*Werner*, Liebigs Annalen 406, 261 (1914), Über Metallverbindungen mit komplex gebundener Oxalsäure.  
*Willstätter u. E. Waldschmidt-Letz*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 54, 2988 (1921), Alkalimetrische Bestimmungen von Aminosäuren und Peptonen.  
*Windaus*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 42, 758 (1909), Über synthetische Versuche in der Imdazolgruppe.  
Ber. d. deutsch. chem. Ges. 43, 499 (1910), Notiz über die Aufspaltung des Imdazolringes.  
*Windaus u. F. Knoop*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 38, 1166 (1905), Überführung von Traubenzucker in Methylimidazol.  
Hofmeisters Beiträge 8, 406 (1906), Zur Konstitution des Histidins.  
*Winterstein u. A. Klüg*, H. S. 59, 141 (1909), Beiträge zur Kenntnis der Homologen des Arginins.



(1921), Über die  
Über die Fir



## INHALT

### Die freien Aminogruppen im Eiweiß

Die Bausteine . . . . .	3
Die Peptidbindung . . . . .	4
Die Molekülgröße der Eiweißkörper . . . . .	9
Das Eiweiß als amphoterer Elektrolyt . . . . .	10
Das Eiweiß als Anhydridkomplex . . . . .	14

### Neue Versuche zur Konstitutionsermittlung

1. Acylierung . . . . .	17
2. Cyanamidanlageung . . . . .	17
3. Methyliertes Eiweiß . . . . .	21

### Versuchsteil

Cyanamidiertes Eiweiß . . . . .	23
Darstellung von Cyanamid . . . . .	23
Anlagerung von Cyanamid an Kasein . . . . .	23
Anlagerung von Cyanamid an Gelatine . . . . .	25
Versuche zur Isolierung von Guanidosäuren und Eiweißhydrolysaten . . . . .	26
Hydrolyse des Kasein . . . . .	29
Hydrolyse der Gelatine . . . . .	34
Methyliertes Kasein . . . . .	52
Schrifttum . . . . .	67

LIBRARY